

Sur le dosage de l'Hémoglobine

THESE

Présentée et publiquement soutenue
devant la Faculté de Pharmacie de Montpellier
le 12 juillet 1936

PAR

JEAN FOURCADE

PHARMACIEN

LICENCIÉ ÈS SCIENCES

ASSISTANT A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER
EX-ASSISTANT DELEGUÉ A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE MONTPELLIER

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE MONTPELLIER
(1^{er} PRIX, MÉDAILLE D'ARGENT, 1928 ET 1929)
(1^{er} PRIX DE TRAVAUX PRATIQUES 1928)
(PRIX COULOUMA, 1931)

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE MONTPELLIER
(PRIX TEMPIÉ-MELON, SCIENCES PHYSIQUES, 1928)

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER
(PRIX SWIECICKI, 1934)

POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(MENTION : PHARMACIE)

MM.

Jury

E. CANALS, professeur, *Président*.

M. MOUSSERON, professeur.

P. CRISTOL, profes. Fac. de Médecine.

Assesseurs.

MONTPELLIER
IMPRIMERIE DE LA PRESSE
3, Rue Jardin-Martel
Tél. 47-84

1936

SUR LE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE

Sur le dosage de l'Hémoglobine

THESE

Présentée et publiquement soutenue
devant la Faculté de Pharmacie de Montpellier
le juillet 1936

PAR

JEAN FOURCADE

PHARMACIEN

LICENCIÉ ÈS SCIENCES

ASSISTANT A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER

EX-ASSISTANT DELEGUÉ A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE MONTPELLIER

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE MONTPELLIER

(1^{er} PRIX, MÉDAILLE D'ARGENT, 1928 ET 1929)

(1^{er} PRIX DE TRAVAUX PRATIQUES 1928)

(PRIX COULOUMA, 1931)

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE MONTPELLIER

(PRIX TEMPIÉ-MELON, SCIENCES PHYSIQUES, 1928)

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER

(PRIX SWIECICKI, 1934)

POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(MENTION : PHARMACIE)

MM.

Jury

E. CANALS, professeur, *Président*.

M. MOUSSERON, professeur.

P. CRISTOL, profes. Fac. de Médecine.

Assesseurs.

MONTPELLIER

IMPRIMERIE DE LA PRESSE

3, Rue Jardin-Martel

Tél. 47-84

1936

Faculté de Pharmacie de Montpellier

ADMINISTRATION

- MM. A. ASTRUC (O *, I. P. ☿) .. Doyen.
A. JUILLET (I. P. ☿) Assesseur.
LEBLAYE (A. ☿) Secrétaire.

PROFESSEURS

- MM. A. ASTRUC (O *, I. P. ☿) .. Pharmacie galénique et industrielle.
C. HOLLANDE (I. P. ☿) Zoologie et Microbiologie.
A. JUILLET (I. P. ☿) Botanique et Matière médicale.
A. FAUCON (O *, I. P. ☿, ☆
C. ✕, G. O. ✕) Pharmacie chimique.
E. CANALS (I. P. ☿) Physique.
M. MOUSSERON Chimie organique.
P. JAULMES, Chargé du Cours Chimie analytique et toxicologie.
E. CANALS (I. P. ☿), Ch. d. c. Chimie minérale.

DOYEN HONORAIRE

G. MASSOL (*, I. P. ☿)

PROFESSEUR HONORAIRE

MM. F. JADIN (O *, I. P. ☿),
Doyen hon. de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg



CHARGES DE COURS

COMPLEMENTAIRES ET AUXILIAIRES

- MM. A. ASTRUC (O *, I. P. ☿) .. Hydrologie.
C. HOLLANDE (I. P. ☿) Zoologie.
A. JUILLET (I. P. ☿) Botanique.
A. FAUCON (O *, I. P. ☿, ☆
C. ✕, G. O. ✕) Fonctions en chimie organique.
M. MOUSSERON Chimie biologique.
P. JAULMES Toxicologie.
MOYE, Doy. hon. Fac. Droit
(* , I. P. ☿) Législation pharmaceutique.

AGREGE

- P. CASTEL (☿) Chargé d'Agrégation.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

- MM. L. FARRE (I. P. ☿) Chimie et Pharmacie.
DAUBIAN-DELISLE *, IP. ☿ Physique.
SUSPLUGAS Histoire naturelle.

Nota. — La Faculté de Pharmacie n'accepte la responsabilité d'aucune des opinions émises par les candidats dans les Thèses ou Synthèses qui lui sont présentées.

A MA MERE

A MON PERE

*En témoignage de mon amour filial
et de ma reconnaissance.*

A MON FRERE

A MA FIANCEE

MEIS ET AMICIS

J. F.

A MON PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR E. CANALS

Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. MOUSSERON

Professeur de Chimie organique à la Faculté de Pharmacie

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. CRISTOL

Professeur de Chimie biologique à la Faculté de Médecine

A TOUS MES MAITRES

J. F.

AVANT-PROPOS

Au moment de présenter ce modeste travail, nous avons le très agréable devoir d'assurer de notre profonde gratitude tous nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie.

Notre reconnaissance va particulièrement à M. le Doyen ASTRUC qui depuis le début de nos études pharmaceutiques nous a constamment dispensé sa bienveillante sollicitude; nous le prions de vouloir bien agréer nos sentiments de sincère attachement.

Notre reconnaissance va aussi à M. le Professeur CANALS qui a guidé nos premiers pas en chimie analytique et qui nous a si souvent éclairé de ses conseils. En acceptant de présider notre jury de thèse, il nous a donné une marque de confiance qui nous a vivement touché.

Nous adressons enfin à M. le Professeur MOUSSERON nos meilleurs remerciements pour l'intérêt qu'il n'a cessé de nous porter depuis notre trop court passage dans son laboratoire.

Nous avons encore le devoir d'assurer de notre gratitude nos Maîtres de la Faculté des Sciences et de la Faculté de Médecine.

Nous n'aurons garde d'oublier ici M. le Doyen GODCHOT qui nous a toujours accordé sa précieuse sympathie.

C'est pour nous une grande joie de pouvoir aussi rappé-

ler tout ce que nous devons à M. le Professeur CRISTOL. C'est lui qui nous a fait aimer la biochimie et qui nous a initié aux recherches propres à cette science; il nous a fait par ailleurs l'honneur de nous prendre comme assistant. A ses côtés, nous avons pu apprécier son inépuisable bonté et bénéficier de ses directives et de ses encouragements. Qu'il nous permette en retour de lui témoigner notre entier devouement et notre respectueuse affection.

Nous nous inclinons enfin avec émotion devant la mémoire de M. le Professeur DERRIEN qui nous accueillit au laboratoire de Chimie Biologique et Médicale et dont le souvenir restera fixé dans notre pensée.

INTRODUCTION

Dans bien des cas pathologiques, il peut être utile de suivre les variations de l'hémoglobinémie. L'étude de certains d'entre eux nous a ainsi amené à nous occuper du dosage de l'hémoglobine.

De nombreuses méthodes permettent de déterminer l'hémoglobinémie, c'est-à-dire, de doser l'ensemble de l'hémoglobine réduite et de l'oxy-hémoglobine que renferme un sang donné, ensemble dont il est toujours question lorsqu'on parle du dosage de l'hémoglobine.

Ces méthodes relèvent de plusieurs principes et diffèrent généralement beaucoup par leur précision et leurs autres caractères.

Parmi les publications récentes, on ne trouve pas de revue critique de l'ensemble de ces méthodes; aussi, il est malaisé de s'informer de leurs possibilités respectives. Nous avons dès lors pensé qu'une telle revue ne serait pas sans intérêt et c'est à la faire que nous nous sommes d'abord attaché dans le présent travail.

Nous nous sommes ensuite préoccupé, en vue de nos recherches cliniques, d'une méthode de dosage du chromoprotéide sanguin qui remplisse les conditions suivantes:

a) Etre assez précise pour nous permettre d'apprécier les variations des hémoglobinémies supérieures à 2 ou 3 centiè-

mes, ces variations pouvant déjà avoir une importance médicale;

b) Etre susceptible d'un emploi courant dans les laboratoires d'hôpital, d'où, être relativement rapide et ne pas dépasser les moyens matériels habituels de ces laboratoires (1).

Comme on le verra plus loin (page 57), la méthode de WONG [144] paraît satisfaire pleinement à ces diverses conditions. Pourtant, lorsque nous en fîmes l'essai, nous fûmes assez loin d'atteindre la précision de 2 % annoncée par son auteur.

L'origine de cette différence étant dans quelques points faibles du mode opératoire de WONG, nous nous sommes proposé, pour réaliser la méthode répondant à nos besoins, de transformer ce mode de façon à les éviter. Nous sommes ainsi parvenu à établir un nouveau mode opératoire qui nous a donné la méthode clinique précise désirée.

Nous avons enfin appliqué notre mode opératoire au sang de divers animaux et à de nombreux sangs humains normaux ou pathologiques.

**

Notre exposé est divisé de la façon suivante:

— Dans un chapitre préliminaire, nous rappelons les propriétés du chromoprotéide sanguin qui peuvent jouer un rôle dans son dosage.

— Dans un deuxième chapitre, nous résumons les prin-

(1) Naturellement, cette méthode devait aussi ne pas nécessiter de prises d'essai trop importantes; mais, cette condition est toujours sous entendue lorsqu'il s'agit de dosages portant sur le sang.

cipales méthodes de dosage de l'hémoglobine et en faisons l'analyse critique.

— Dans un troisième chapitre, nous décrivons la méthode de WONG et les modifications que nous avons apporté à son mode opératoire, puis montrons la valeur du nouveau mode ainsi obtenu.

— Enfin, dans un quatrième chapitre, nous rapportons les hémoglobinémies que notre mode opératoire nous a permis de déterminer.

CHAPITRE PREMIER

PRELIMINAIRES

On sait que l'hémoglobine, chromoprotéide rencontré dans le sang de la plupart des espèces animales, est formée par l'union à une histone, la globine, d'un pigment ferrugineux tétrapyrrolique du groupe des « hèmes » (1). Il semble, d'après les données actuelles (2), que le pigment est identique pour toute hémoglobine, quelle que soit son origine; par contre, les globines diffèreraient légèrement les unes des autres, engendrant ainsi des hémoglobines très voisines, mais cependant dissemblables, par leur union au groupement prosthétique ferrugineux. Quoi qu'il en soit, dans l'hémoglobine des divers mammifères, on a toujours la même proportion d'environ un vingtième d'hème pour dix-neuf vingtièmes de la globine correspondante.

La constance remarquable de la proportion de fer retrouvée à l'analyse de divers échantillons d'hémoglobine d'une espèce animale donnée a conduit à penser que, pour

(1) Selon la nomenclature de FISCHER, TREIBS et ZEILE [32].

(2) Voir à ce sujet les articles sur l'hémoglobine de TIFFENAU [129] et de NOLF [94].

chaque espèce, ce chromoprotéide était une molécule bien définie.

Les teneurs en fer étant, d'autre part, très petites et les molécules d'hémoglobine ne pouvant renfermer moins d'un atome de ce métal, le poids moléculaire minimum trouvé pour chacune de ces molécules est déjà très élevé (poids moléculaires égaux à 17.000, en moyenne). Néanmoins, certaines méthodes physicochimiques telles que celles de ADAIR [4] et de SVEDBERG [123] ont récemment permis d'établir que les poids moléculaires effectifs des hémoglobines étaient beaucoup plus forts, tout au moins dans le cas des hémoglobines vraies (celles des vertébrés); leur molécule réelle correspondrait, en effet, à quatre fois leur molécule minimum, donc, aurait pour P. M. environ 68.000 (3) et serait à quatre atomes de fer.

Ces valeurs si élevées du poids moléculaire font comprendre pourquoi les hémoglobines, bien que cristallisables, se comportent en colloïdes.

Toutes les hémoglobines présentent pratiquement les mêmes propriétés, quelle que soit leur origine animale; aussi, le plus souvent, on considère seulement « l'hémoglobine » en général, comme nous le ferons désormais.

A l'air, l'hémoglobine fixe immédiatement de l'oxygène pour donner l'oxyhémoglobine, corps très voisin; par suite, *in vitro*, c'est uniquement sous cette forme que se trouve le chromoprotéide sanguin quand les manipulations du sang n'ont rien de spécial. L'hémoglobine se combine encore avec l'oxyde de carbone pour lequel elle a une grande affinité,

(3) Voir pour plus de détails l'article de ROCHE sur la biochimie comparée des pigments respiratoires [111].

l'acide cyanhydrique, etc... Toutes ces molécules: $O^2.CO$, CNH , etc., sont fixées par l'intermédiaire du fer et chacune d'elles correspond à un atome de ce métal, c'est-à-dire, à la molécule minimum d'hémoglobine; le symbole Hb ayant été attribué à cette molécule minimum, la formule chimique de ces divers dérivés de l'hémoglobine est donc respectivement: $(HbO^2)^4$, $(HbCO)^4$, $(HbCNH)^4$, etc... Par une action convenable, surtout facile à réaliser dans le cas de l'oxyhémoglobine, la dissociation complète de ces composés, régénérant l'hémoglobine, est obtenue; à partir de l'oxyhémoglobine, on peut aussi régénérer l'hémoglobine grâce aux réducteurs, et c'est là la raison qui fait si souvent distinguer l'hémoglobine sous le nom « d'hémoglobine réduite ».

L'hémoglobine a encore d'autres dérivés importants ; rappelons simplement :

- la méthémoglobine, facilement obtenue par l'action sur Hb^4 ou $(HbO^2)^4$ des acides ou des bases dilués ou encore par celle des oxydants légers ; sa constitution est encore controversée;

-- l'hématine, groupement prosthétique de l'oxyhémoglobine, surtout connue par son chlorhydrate, l'hémine, qui prend naissance quand l'acide chlorhydrique faible agit un temps suffisant sur la méthémoglobine.

Enfin, la couleur de l'hémoglobine et des dérivés que nous en avons cité est bien connue; on sait que leur solution aqueuse est parfaitement transparente et que, examinée en lumière transmise, elle se montre d'une teinte variant du jaune orangé au rouge vif rubis selon le composé, sa concentration, et l'épaisseur de la solution traversée par la

lumière (4); on sait aussi qu'à chacun de ces corps correspond un spectre de bandes d'absorption caractéristique en relation avec ces colorations (5).

(4) Les solutions d'hémoglobine réduite paraissent toutefois vertes lorsqu'on les examine en couche très mince (HENOCQUE [47]).

(5) Pour de plus amples renseignements sur les propriétés de l'hémoglobine, nous renvoyons à l'ouvrage de POLONOVSKI et LES-PAGNOL [102].

CHAPITRE II

LES PRINCIPALES METHODES DE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE ET LEURS CARACTERISTIQUES (1)

En général, les méthodes de dosage de l'hémoglobine s'appliquent au sang défibriné (2), ou plus rarement au sang total; dans ce dernier cas, avant tout début de coagulation, on mesure le sang puis le dilue à l'aide de pipettes mélangeuses spéciales, sauf dans la méthode de TALLQVIST [126, 127] où il suffit de le pomper avec un papier absorbant convenable.

Ces diverses méthodes sont basées sur les unes ou les autres des propriétés du chromoprotéide sanguin (ou de ses dérivés) que nous avons rappelées, et en tirent leurs principales caractéristiques.

Des différentes classifications que l'on peut en donner, voici celle qu'il nous a paru le plus rationnel d'adopter:

(1) On pourra consulter à ce sujet les travaux ou les traités de LAMBLING [70], BESANÇON et LABBÉ [9], MOREL [85], JOLLY [60], BÜRKER [16], et PETERS et VAN SLYKE [99].

(2) Ce qui ne nécessite pratiquement aucune correction des résultats, le sang ne produisant qu'environ 3 pour 1000 de fibrine.

I. — Méthodes physiques, qui se divisent en :

- A) Méthodes chromoscopiques;
- B) Méthodes colorimétriques;
- C) Méthodes spectroscopiques;
- D) Méthodes spectrophotométriques.

II. — Méthodes gazométriques.

III. — Enfin, méthodes basées sur le dosage du fer, qui sont purement chimiques.

§ 1. — MÉTHODES PHYSIQUES.

Ces méthodes sont fondées soit sur la coloration de l'oxy-hémoglobine — les dosages portant alors directement sur le sang étudié, ou plus souvent, sur une dilution de ce sang dans l'eau distillée —, soit sur la coloration d'un autre dérivé du chromoprotéide sanguin. Elles profitent de ce que les constituants de l'hémoglobinémie sont pratiquement les seuls corps colorés du sang (3).

A. — Méthodes chromoscopiques.

Elles comprennent: des méthodes basées sur l'emploi de gammes colorées étalon, et des méthodes par dilutions.

(3) Plus exactement, le sang renferme encore comme corps colorés des pigments biliaires; mais, ceux-ci ne s'y trouvant qu'en proportion insignifiante (1,56 à 7,8 mg pour 100 cm³ selon HANSKAR [44], on peut ne pas en tenir compte ici.

I. — Méthodes des « gammes colorées » :

Leur principe consiste à obtenir avec le sang étudié ou une dilution convenable de ce sang, selon un mode opératoire bien défini spécial à chaque méthode, une « teinte de comparaison » ; cette teinte est alors comparée à celle d'une gamme étalon appropriée, établie de façon que chacun de ses éléments corresponde à une concentration en hémoglobine déterminée ; on déduit aussitôt de cet examen entre quelles valeurs se trouve l'hémoglobinémie cherchée.

Parmi ces méthodes, les plus connues sont :

1° Celle de WELCKER [140], dont la gamme se compose des taches données sur du papier blanc absorbant par différentes dilutions d'un sang normal, et dans laquelle la teinte de comparaison, établie elle aussi sur papier, est préparée avec une dilution du sang analysé.

2° Celle de HAYEM [45], dans laquelle on compare une dilution convenable des sangs étudiés à une échelle peinte.

3° Celle de QUINCKE [108], dont l'échelle colorée est constituée par des solutions ammoniacales d'acide picrique et de carmin en proportions convenables, semblables à celles introduites dans la technique hématologique par RAJEWSKI [109].

4° Celle de TALLQVIST [126, 127], qui rappelle celle de WELCKER, mais dont la gamme est peinte et la tache de comparaison obtenue avec le sang pur ; cette méthode est une de celles qui permettent de doser l'hémoglobine le plus simplement.

5° Enfin, celle décrite plus récemment par HALLION et BORRIEN [43] et qui est calquée sur celle de QUINCKE.

Ces diverses méthodes chromoscopiques sont relativement

pratiques, et les moyens qu'elles mettent en œuvre restent simples.

Malheureusement, comme FLEURY [30] et bien d'autres (4) l'ont reconnu, leur sensibilité est limitée. En effet, même en utilisant des gammes de vingt échelons, nombre rarement atteint, les erreurs relatives minimum théoriques données par les comparaisons chromoscopiques sont déjà considérables; ainsi, si l'on a choisi pour les divers échelons des concentrations réalisant une progression géométrique, ce qui a l'avantage de rendre ces erreurs relatives d'égale importance, elles sont alors de 11,4 pour cent. La difficulté de telles mesures chromoscopiques, difficulté souvent constatée (REGNARD [110]), rend toutefois les erreurs relatives de comparaison effectivement commises beaucoup plus élevées; d'autre part, les erreurs diverses qu'entraînent les manipulations s'ajoutent aux précédentes; on voit dès lors combien la précision des méthodes des gammes colorées est minime.

Une autre cause d'erreur vient d'ailleurs abaisser encore cette précision: c'est celle inhérente à l'instabilité des gammes étalon utilisées. La conservation indéfinie, sans altérations, de ces gammes est, en effet, pratiquement impossible, qu'elles soient constituées par des taches de sang (5), une échelle peinte, ou même des solutions de picro-carmin (6).

En dehors de leur imprécision, les méthodes basées sur l'emploi de gammes colorées présentent d'autres défauts moins importants. En particulier, au lieu d'exprimer leurs

(4) CABANES [18], CANALS et CABANES [19], etc...

(5) Comme WELCKER lui-même le reconnaît [140].

(6) Dans ce dernier cas, notamment, on a toujours, à la longue, précipitation d'une partie du carmin, d'où affaiblissement de la teinte, par départ de gaz ammoniac (RAJEWSKI [109]).

résultats en grammes d'hémoglobine pour cent centimètres cubes de sang, ce qui est la seule notation rationnelle, la plupart de ces méthodes les rapportent à un sang considéré comme normal et auquel est attribué la valeur arbitraire 100, tandis que les autres (méthodes de WELCKER et de HAYEM notamment) les traduisant en « richesse globulaire », notation tout à fait artificielle; ce sont là des complications bien inutiles qui rendent nécessaire, lorsqu'on veut exprimer selon le mode normal les hémoglobinémies ainsi mesurées, l'établissement préalable de la correspondance exacte des gammes en hémoglobine (7).

Sans insister davantage sur ces méthodes, nous noterons pour conclure que leur emploi est restreint, cet emploi ne subsistant d'ailleurs qu'en raison de leur simplicité; il est toutefois regrettable de constater que c'est surtout en clinique qu'on y fait encore appel (8), bien que ce soit là où l'exactitude des résultats puisse devenir le plus nécessaire.

II. — *Méthodes par dilutions:*

Dans ces méthodes, à l'inverse de ce qui précède, on n'utilise qu'une seule teinte étalon consistant en un tube scellé renfermant un liquide coloré approprié; on place alors dans un tube gradué spécial *T*, de même diamètre que le tube scellé, un volume convenable du sang étudié et on le dilue jusqu'à ce que sa teinte paraisse identique à celle de l'étalon; le chiffre lu sur la graduation du tube *T* au niveau de l'affleurement de la dilution exprime alors directement l'hémoglobinémie du sang étudié, les tubes *T* étant empiriquement gradués en conséquence.

(7) Ce qui oblige de recourir à une autre méthode.

(8) La méthode de TALLQVIST, en particulier, y étant très souvent utilisée.

Nous citerons seulement parmi ces méthodes:

1° Celle de HOPPE-SEYLER [51], dont l'étalon est une solution titrée d'oxyhémoglobine cristallisée.

2° Celle de GOWERS, dont l'étalon est une solution glycéri-
née convenable de picro-carmin et d'ammoniaque.

3° Celle de SALHI, dont l'étalon est une solution titrée d'hématine acide — composé beaucoup plus stable que l'oxy-hémoglobine — l'oxyhémoglobine des sangs étudiés étant elle-même transformée ici en ce composé, ce qu'on réalise simplement en utilisant pour diluer ces sangs une solution faible d'acide chlorhydrique.

4° Celle enfin de ROSTOSKI et CRECELIUS [114], dérivée de la précédente, mais dans laquelle le tube *T* est remplacé par un ruban de gélatine imprégné de chlorhydrate d'hématine.

Les méthodes chromoscopiques par dilutions sont, comme celles du groupe I, des méthodes pratiques et ne mettant en œuvre que des moyens simples, mais leur sensibilité est pareillement limitée. Cela résulte principalement d'une part, de l'inconvénient organique de la « technique des dilutions » — c'est-à-dire, de l'impossibilité, lors de la dilution du sang étudié, de revenir en arrière si la teinte de l'étalon a été dépassée —, et d'autre part, de la difficulté pratique que présente l'appréciation de l'égalité de deux teintes lorsque, comme ici, elles sont réparties dans deux tubes à essai et directement examinées. En définitive, on peut dire, avec CANALS et CABANES [19], que les erreurs relatives correspondant à l'application des méthodes chromoscopiques du groupe II dépassent normalement 5 %, sans atteindre toutefois celles données par les méthodes basées sur l'emploi de gammes colorées.

Par ailleurs, ici encore, les étalons constituent une cause d'erreur supplémentaire, la conservation indéfinie des solutions d'oxyhémoglobine ou d'hématine acide n'étant pas plus assurée que celle des solutions de picro-carmin (9) ; toutefois, notons qu'au dire de ROSTOSKI et CRECELIUS la teinte de leur ruban serait inaltérable.

Enfin, du point de vue de l'expression des résultats, on retrouve dans les méthodes par dilution — sauf dans celles de HOPPE-SEYLER, dans celle réalisée par PEYRE [101] par adaptation de la méthode de SALHI, et dans quelques autres — le défaut signalé pour celles des gammes colorées.

Dans ces conditions, on s'explique aisément que l'utilisation, dans le dosage de l'hémoglobine, des méthodes chromoscopiques par dilutions reste, elle aussi, très limitée.

B. — *Méthodes colorimétriques.*

On sait que les méthodes colorimétriques sont basées sur les lois de LAMBERT et de BEER, lois relatives au phénomène de l'absorption des radiations lumineuses par les milieux colorés transparents.

Dans ces méthodes, étant donné des solutions de corps colorés dans un solvant incolore identique, on ne tient pas compte de l'absorption due au solvant, négligeable devant celle du corps dissous (10) ; les lois précédentes se traduisent alors par l'équation de BEER-LAMBERT :

$$\frac{I}{I_0} = e^{-K l c} \quad : (I),$$

(9) Ainsi, les solutions d'oxyhémoglobine ne se conservent pas plus de huit jours (LAMBLING [70]).

(10) Comme l'ont vérifié, notamment, CANALS et CABANES [19].

équation qui relie l'intensité incidente, I_0 , d'une radiation traversant la solution d'un corps coloré à celle transmise, I , à travers cette solution, en fonction de l'épaisseur l de la couche absorbante et de la concentration c du corps dissous (K étant le coefficient d'absorption caractéristique du corps coloré et de la longueur d'onde de la radiation utilisée, et e la base des logarithmes népériens). Dans les comparaisons colorimétriques, on applique simultanément cette relation à deux solutions, ce qui permet, lorsqu'il s'agit de deux solutions A et B d'une même substance colorée, d'établir l'égalité qui constitue le principe fondamental de la colorimétrie :

$$\frac{c_A}{c_B} = \frac{I_B}{I_A} \quad : (II),$$

égalité dans laquelle c_A , c_B sont les concentrations respectives du corps coloré, et I_A et I_B l'épaisseur des couches absorbantes de A et de B quand, l'intensité de la lumière incidente sur les deux solutions étant identique, celle des lumières transmises par chacune d'elles l'est aussi. Grâce à l'égalité (II), on mesure facilement la concentration de toute solution B d'un corps coloré donné, réalisant ainsi son dosage colorimétrique, en prenant comme solution A une solution de titre connu de cette même substance, et en déterminant I_A et I_B par comparaison avec un colorimètre.

Naturellement, les relations (I) et (II) ne sont exactes que dans le cas d'une lumière incidente monochromatique; toutefois, dans certaines conditions, on peut encore les appliquer quand la lumière incidente est une lumière polychromatique; en particulier, l'égalité (II) reste pratiquement vérifiée en lumière blanche quand les lumières émergeant de A et de B ont la même composition spectrale, ce qui précisément a lieu lorsque A et B sont des solutions

d'un même corps coloré (11), et seulement dans cette alternative. Par suite, quand la lumière blanche est employée dans les mesures colorimétriques, c'est-à-dire dans la grande majorité des cas, on voit que pour appliquer correctement le principe fondamental sur lequel ces mesures sont basées il importe de n'utiliser comme étalons que des solutions dont le corps dissous et le solvant sont identiques à ceux des solutions à doser correspondantes.

Cette condition théorique remplie, les travaux de BAUDOUIN et BÉNARD [6], de VLÈS [139], et surtout de CANALS et CABANES [19] ont montré que diverses conditions pratiques devaient également l'être pour que l'emploi des méthodes colorimétriques soit correct.

On peut donner de ces dernières la liste suivante:

1° N'utiliser qu'une intensité de teinte bien choisie (teinte sensible);

2° Faire les mesures en lumière artificielle, dans une chambre noire, avec une radiation incidente d'intensité convenable et constante;

3° Reposer suffisamment l'œil entre chaque lecture et ne se servir dans tout dosage que du résultat moyen d'un grand nombre d'entre elles (12);

4° Procéder de façon telle que le rapport des concentrations des deux solutions comparées en la substance colorée ne dépasse pas 1,5 et que l'épaisseur moyenne des deux couches absorbantes soit d'environ 15 mm.

Quant toutes ces conditions sont satisfaites, on peut

(11) Comme toujours, dans un même solvant incolore.

(12) Dans ces mesures, la substitution — parfois préconisée — de la cellule photoélectrique à l'œil ne paraît encore présenter aucun avantage du point de vue de la précision.

alors prétendre, dans les dosages par colorimétrie, à des résultats dont l'erreur relative (erreur provenant surtout de la mesure optique) sera inférieure à 5 %, ou même, dans certaines limites, à 1,5 ou 2 pour cent (13); les dosages colorimétriques sont donc susceptibles d'une notable précision. Malheureusement, nous verrons que les erreurs dépassent toujours ces taux de 1,5 ou de 2 pour cent quand il s'agit de l'hémoglobine.

On sait que la détermination colorimétrique des hémoglobinémies peut être faite selon diverses méthodes et que dans la plupart d'entre elles l'hémoglobine est dosée à l'état d'oxyhémoglobine, ces dosages portant simplement sur une dilution convenable par l'eau distillée des sangs étudiés (14).

Parmi ces méthodes, les plus importantes sont:

1° Celle dont l'étalon est une solution titrée d'oxyhémoglobine cristallisée (l'hémoglobine à doser étant à l'état d'oxyhémoglobine) et dans laquelle on fait la comparaison colorimétrique avec l'appareil de DUBOSQ, ou mieux, avec celui de DUBOSQ-PELLIN qui n'exige que 2 à 3 cm³ de chaque liquide.

2° Celle de PALMER [98], semblable à la précédente, mais dans laquelle on transforme pour le dosage l'oxyhémoglobine en carboxy-hémoglobine, l'étalon étant lui-même une solution titrée de carboxyhémoglobine.

3° Les modifications selon WU [145] de la méthode de COHEN et SMITH [20] et de la méthode STADIE [121], modifications ne différant des méthodes ci-dessus que parce qu'elles dosent respectivement l'hémoglobine à l'état d'hé-

(13) D'après les résultats de CABANES [18].

(14) Dilution au centième, le plus souvent,

matine acide et à l'état de cyanohémoglobine en utilisant comme étalon une solution titrée de ces mêmes composés.

4° Celle de JOLYET et LAFFONT [61], rappelant la première, sauf par l'étalon qui n'est plus une solution d'oxyhémoglobine, mais une lame de verre coloré à faces parallèles de teinte et d'épaisseur appropriées.

5° Les deux méthodes de MALASSEZ: la première [81], simple amélioration pratique de celle de JOLYET et LAFFONT réalisée par l'utilisation d'un appareillage adapté, la seconde [82], copie de la précédente dont elle ne diffère que par l'adoption comme étalon d'un verre coloré prismatique, donc d'épaisseur variable.

6° Celle de FLEISCHL-MIESCHER, analogue à la première méthode de MALASSEZ, mais dans laquelle l'hémoglobine est dosée à l'état d'hématine alcaline dont la teinte rouge est plus intense que celle de l'oxyhémoglobine, les dilutions du sang s'y faisant non plus avec de l'eau distillée mais avec une solution de carbonate de sodium à 1 pour mille.

7° Enfin, celle de NEWCOMER [91], du même type que celle de FLEISCHL-MIESCHER, l'hémoglobine étant ici dosée par l'intermédiaire de l'hématine acide.

De toutes ces méthodes, seules les premières remplissent la condition théorique dont la satisfaction est indispensable à l'emploi correct de la colorimétrie. En effet, dans les suivantes, on se sert comme étalon de verres colorés (15), alors qu'il s'agit de doser des solutions d'oxyhémoglobine, d'hématine alcaline, ou d'hématine acide; dans ces condi-

(15) Verres dont la correspondance en oxyhémoglobine, en hématine alcaline, ou en hématine acide a été établie au préalable empiriquement.

tions, on ne peut rien présumer de l'importance des erreurs relatives correspondant à l'utilisation, parfaitement arbitraire, de tels étalons, et en fait, ces erreurs sont souvent assez notables surtout lorsqu'on a affaire à des verres prismatiques, donc intervenant sous une épaisseur variable.

Au contraire, avec les premières méthodes — dans lesquelles l'étalon et le liquide coloré étudié sont des solutions d'un même dérivé de l'hémoglobine dans un même solvant (16) — on peut satisfaire à toutes les conditions du dosage colorimétrique parfait. Ces méthodes ne sont cependant pas meilleures que les autres, car la rapidité d'altération tant des solutions d'oxyhémoglobine (17), que des solutions de carboxyhémoglobine, d'hématine alcaline, ou de cyanohémoglobine, ne permet pas d'obtenir constamment des résultats précis. Il en serait autrement si l'on préparait extemporanément la solution titrée étalon du dérivé de l'hémoglobine utilisé avant chaque série de mesures; malheureusement, la préparation de ces solutions titrées est longue et comporte d'ailleurs l'étalonnage de chacune d'elles au moyen d'une autre méthode de dosage du chromoprotéide sanguin; quant à l'obtention directe de telles solutions, elle serait encore plus ardue et ne pourrait se faire aisément qu'en hiver, notamment dans le cas de l'oxyhémoglobine (LAMBLING [70]); aussi, cette dernière façon d'opérer est très difficilement réalisable.

Pour toutes ces raisons, les méthodes colorimétriques de dosage de l'hémoglobine sont, comme les chromoscopiques, à délaissier chaque fois qu'une certaine précision devient nécessaire.

(16) Les dilutions de sang employées pouvant largement être assimilées à des dilutions de son élément hémoglobinique seul.

(17) Rapidité d'altération déjà rappelée page 22.

C. — Méthodes spectroscopiques.

Ces méthodes sont basées sur les propriétés du spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine.

Les principales sont :

1° La méthode de PREYER [104], dans laquelle on examine d'abord le spectre du sang étudié sur une dilution dans l'eau distillée telle que toutes les radiations du spectre, sauf une partie des radiations rouges, soient encore absorbées; on poursuit ensuite la dilution, sans interrompre l'examen spectroscopique, jusqu'au moment où le spectre s'enrichit de quelques radiations vertes, moment où l'on note dans quelles proportions le sang se trouve étendu. Ceci fait, on répète ces observations, toutes choses égales, avec une solution titrée étalon d'oxyhémoglobine; la concentration en $(\text{HbO}_2)^4$ des diverses dilutions correspondant à l'apparition du vert étant la même, il est facile d'en déduire l'hémoglobinémie cherchée.

2° La méthode de LESSER [75], dans laquelle on produit simultanément et selon des conditions identiques deux spectres superposés, le premier correspondant à une solution titrée étalon d'oxyhémoglobine, et le second, à une dilution du sang étudié dans l'eau distillée; ici encore, cette dilution, d'abord peu poussée, est poursuivie jusqu'à ce que la largeur des bandes d'absorption homonymes des deux spectres devienne identique; la dilution sanguine et la solution étalon ont alors même titre en oxyhémoglobine, d'où les résultats.

3° Enfin, la méthode de HENOCQUE [48], qui consiste à déterminer l'épaisseur sous laquelle le sang étudié donne, dans des conditions bien fixées, le spectre de l'oxyhémoglobine dont les deux bandes d'absorption et la bande intermédiaire sont égales. De la valeur obtenue, on déduit

immédiatement l'hémoglobininémie cherchée grâce à une table empirique dressée une fois pour toutes par l'examen, dans les mêmes conditions et surtout avec la même intensité lumineuse, d'une série de solutions titrées d'oxyhémoglobine.

L'observation des divers indices sur lesquels reposent les méthodes ci-dessus est très sujette à erreur, qu'il s'agisse de l'apparition du vert dans un spectre ou de la formation de bandes d'absorption, bandes dont les bords sont toujours confus; on ne peut par conséquent songer à obtenir une grande précision lorsqu'on dose spectroscopiquement l'hémoglobine.

Ces dosages présentent d'ailleurs une autre cause d'erreur qui suffirait déjà à leur enlever toute exactitude; en effet, les uns (PREYER et LESSER) nécessitent une comparaison à une solution étalon d'oxyhémoglobine; comparaison dont nous avons déjà rappelé l'inconvénient (18), tandis que les autres (HENOCQUE) ont recours à une intensité lumineuse bien définie qu'il est, en pratique, toujours difficile de réaliser.

En résumé, les méthodes spectroscopiques de dosage de l'hémoglobine sont encore des méthodes peu précises, leur précision ne dépassant pas, notamment, celle des méthodes chromoscopiques; aussi, leur importance est bien minime, et leur emploi se limite, presque à celui de la plus simple d'entre elles, celle de HENOCQUE.

(18) Pages 22 et 27.

D. — *Méthodes spectrophotométriques.*

Imaginées par BUNSEN et ROSCOË [15], puis élevées au rang de méthodes générales d'analyse par VIERORDT [138] qui le premier les utilisa, les méthodes de ce groupe ont depuis été très souvent employées dans le dosage des corps colorés en solution.

Ces méthodes sont basées sur les mêmes lois que les colorimétriques et s'appliquent pareillement à des solutions de corps colorés dans un solvant incolore identique. Par suite, on a, ici encore, la relation de BEER-LAMBERT (19) :

$$\frac{I}{I_0} = e^{-K l c} \quad : (I),$$

Les dosages spectrophotométriques proprement dits consistent à établir la concentration c des solutions étudiées à l'aide de cette relation en opérant sous une épaisseur l constante (20). Dans ce but, on place ces solutions dans des cuves de largeur égale à l et l'on détermine une fois pour toutes les coefficients K relatifs à la longueur d'onde λ de la radiation utilisée et aux divers corps colorés à doser; il suffit

(19) Dans laquelle, nous l'avons vu (page 23), I et I_0 représentent les intensités incidente et réfractée d'une radiation de longueur d'onde λ traversant une solution d'un corps coloré d'épaisseur l , c étant la concentration du corps dissous et K le coefficient d'absorption caractéristique de ce corps et de λ .

(20) Les concentrations c peuvent encore s'établir en opérant à extinction constante et sous une épaisseur variable, ce qui constitue la spectrocoulométrie. Les méthodes de dosage correspondantes n'ayant pas été appliquées au chromoprotéide sanguin, il n'en sera pas question dans ce travail; ces méthodes n'ont d'ailleurs aucune supériorité sur les colorimétriques (BAUDOUIN et BERNARD [6]), surtout dans le rouge et le violet (CANALS et CABANES [19]).

alors de mesurer la valeur des rapports $\frac{I}{I_0}$, ce qui constitue

de simples mesures photométriques, pour pouvoir calculer les concentrations c cherchées. Quant à la détermination des coefficients K , on la fait en appliquant l'équation (I) à des solutions de concentration c connue de chacun des corps colorés considérés, ce qui revient aussi à mesurer la valeur de rapports $\frac{I}{I_0}$.

Comme en colorimétrie, la relation (I) n'est exacte que dans le cas d'une lumière incidente I_0 monochromatique ; mais, alors que pratiquement les mesures colorimétriques pouvaient être faites en lumière blanche, il importe, au contraire, ici d'adopter une longueur d'onde λ convenable (21) et de s'en tenir toujours exactement à cette longueur d'onde car les coefficients K diffèrent généralement beaucoup selon les λ . C'est d'ailleurs pour pouvoir faire aisément les déterminations photométriques dans une plage spectrale très limitée et de longueur d'onde moyenne égale à la longueur d'onde voulue que l'on a recouru à la spectrophotométrie dans la présente application des lois de LAMBERT et de BEER.

Pour réaliser une mesure spectrophotométrique, on disperse un faisceau de lumière blanche par réfraction à travers un prisme et l'on fait traverser à une moitié du fais-

(21) Une valeur élevée du rapport d'absorption facilitant les mesures spectrophotométriques, cette longueur d'onde est toujours celle qui correspond au plus élevé des coefficients K relatifs au corps coloré à doser.

ceau réfracté l'épaisseur l employée (22) de la solution étudiée; on obtient ainsi deux demi-spectres S et S_0 (juxtaposés ou superposés selon les spectrophotomètres) qui ont, dans la région correspondant à la longueur d'onde λ adoptée, I et I_0 comme intensités lumineuses respectives; dès lors, la comparaison photométrique de S et S_0 dans cette région

donne la valeur du rapport $\frac{I}{I_0}$ cherchée. Pour faire cette

comparaison photométrique, on atténue l'intensité I_0 jusqu'à ce qu'elle égale I et l'on établit l'expression de I en fonction de I_0 d'après la grandeur de cette atténuation.

C'est par les moyens imaginés pour réaliser l'atténuation de I_0 que diffèrent surtout les méthodes de dosage spectrophotométriques et les spectrophotomètres qu'elles utilisent. Dans les plus anciennes, et notamment dans celle de VIERORDT [138], on a recours au rétrécissement de la demi-fente du collimateur dont S_0 dérive; mais, cette façon de faire est peu recommandable car elle donne deux demi-spectres de pureté différente, d'où difficilement comparables; aussi, certains appareils permettent de substituer à ce rétrécissement un réglage par volets mobiles, bien préférable. Dans quelques méthodes postérieures, comme celle de Govi, on opère simplement selon la loi fondamentale de la photométrie (23), ce qui aboutit à des appareils peu pratiques. Enfin, dans les autres méthodes et, en particulier, dans celles

(22) Cette épaisseur est souvent de 1 cm.; il est toutefois préférable, dans chaque catégorie de dosages, de choisir pour l une valeur telle que les intensités transmises, I , au cours des diverses mesures (la mesure d'étalonnage y compris) ne varient si possible qu'entre 0,15 et 0,6 I (selon les observations de MOREL) [85]).

(23) C'est-à-dire, d'après la loi suivante: *Les intensités lumineuses varient en raison inverse du carré de la distance.*

de HÜFNER [55], CROVA [22], TRAUNIN [130], GOUY [39], BRANLY [12], etc... I. est atténuée par polarisation, moyen de beaucoup le meilleur.

L'emploi de la spectrophotométrie a depuis longtemps été étendu au dosage du chromoprotéide sanguin, notamment par VIERORDT [138], BRANLY [13], de SAINT-MARTIN [115], WILLIAMSON [141], PONDER [103], DENES [23], etc...

Pratiquement, c'est toujours sur l'oxyhémoglobine que portent ici les dosages, les liquides soumis aux mesures étant des solutions des sangs étudiés dans l'eau distillée (24); aussi, on utilise de préférence une longueur d'onde λ comprise entre 5770 et 5890 Å, ces deux valeurs délimitant la plus forte bande d'absorption du spectre de l'oxyhémoglobine.

Les dosages spectrophotométriques de l'oxyhémoglobine nécessitent au préalable un étalonnage et un réglage minutieux du spectrophotomètre utilisé, ainsi que la détermination précise du coefficient K correspondant à l'oxyhémoglobine et à la longueur d'onde λ choisie (25). Pour déterminer ces coefficients, il faut disposer d'une solution d'oxyhémoglobine de titre convenable et exactement connu, solution dont la préparation s'impose, par conséquent, en premier lieu; ici, pour plus de précision, ces solutions sont toujours directement réalisées à partir d'oxyhémoglobine cristallisée, ce qui est, nous l'avons vu (page 27), très ardu.

En définitive, on ne peut donc doser spectrophotométriquement l'oxyhémoglobine qu'après avoir effectué une série

(24) Solutions dont le taux de dilution se situe vers 1/175, valeur la plus appropriée (LAMBLING [70]).

(25) Plus exactement, il est évident que c'est seulement du coefficient moyen correspondant à la plage spectrale $\lambda \pm d\lambda$ qu'il s'agit ici.

de manipulations préliminaires longues et ingrates. Mais, une fois montées, les méthodes spectrophotométriques permettent de doser le chromoprotéide sanguin très rapidement et avec une grande précision car notre œil apprécie les différences d'éclairement avec assez d'exactitude (26) (ce qui rend minime l'erreur faite sur la mesure optique, mesure qui — comme en colorimétrie — est la moins sensible). On peut, par suite, évaluer l'erreur relative maximum donnée par les dosages spectrophotométriques à environ 5 %, et parfois même à 2 % (BRANLY [13], de SAINT-MARTIN [115]) lorsqu'on opère avec un appareil convenable et dans de bonnes conditions.

En résumé, on voit que si l'on ne tient pas compte des difficultés de leur montage, les méthodes de dosage de l'hémoglobine basées sur la spectrophotométrie sont très recommandables (27) ; elles ont malheureusement l'inconvénient d'imposer encore, en dehors du travail préliminaire, la possession d'un spectrophotomètre ; aussi, on ne peut généralement recourir à elles que dans quelques laboratoires privilégiés.

*
**

Avant d'en terminer avec les méthodes physiques, nous devons signaler qu'on a aussi utilisé, pour doser l'hémoglobine, des méthodes réfractométriques et des méthodes opacimétriques ; ainsi, on peut citer les méthodes de HOWARD [53] et de STODDARD et ADAIR [122] parmi les premières, et

(26) Et en particulier, mieux que les différences de teinte.

(27) On sait que la spectrophotométrie permet aussi — ce qui en fait surtout l'intérêt — de doser séparément chaque corps coloré d'une solution de plusieurs colorés, et par exemple, de plusieurs composés hémoglobiques.

celles de MANTEGAZZA et de BIZZOZERO [11] parmi les secondes.

Ces applications de la réfractométrie et de l'opacimétrie à la détermination des hémoblobinémies étant totalement dépourvues de précision et, par conséquent, d'intérêt, nous nous bornons à les signaler.

§ 2. — METHODES GAZOMETRIQUES.

Ces méthodes sont basées sur le fait que l'hémoglobine engendre facilement les composés tels que l'oxyhémoglobine ou surtout que la carboxyhémoglobine dans lesquels une molécule O_2 ou CO correspond exactement à un atome de fer, et qu'on peut ensuite dissocier complètement ces composés par une action convenable.

Elles se divisent en deux groupes selon qu'est utilisée la formation et la dissociation de l'oxyhémoglobine ou celles de la carboxyhémoglobine.

Voici en quoi consiste le principe de ces méthodes :

A. — Dans celles du premier groupe, on transforme complètement en oxyhémoglobine (simplement par une bonne aération) l'hémoglobine d'un volume connu du sang étudié, puis on soumet cet oxyhémoglobine à l'action du vide barométrique, combinée ou non à celle d'un ferricyanure ; ceci suffit pour dissocier entièrement cette oxyhémoglobine ; on déduit alors facilement l'hémoblobinémie cherchée de la mesure de la quantité d'oxygène dégagée, compte tenu de la minime proportion de ce gaz qui était, d'autre part, dissoute dans le plasma.

Quelques méthodes de ce groupe font toutefois exception à ce mode opératoire, l'oxyhémoglobine n'y étant plus dis-

sociée, mais dosée directement par un réducteur convenable ce qui revient à réaliser indirectement la précédente mesure d'oxygène.

B. — Dans celles du deuxième groupe, on fait agir sur le sang non plus l'air mais l'oxyde de carbone; c'est alors la mesure du volume de CO donné par dissociation ultérieure de la carboxyhémoglobine formée qui permet le calcul de l'hémobloblinémie, ce qui évite la correction de tout à l'heure.

Les plus connues des méthodes gazométriques de dosage de l'hémoglobine sont:

I. — D'une part, quelques méthodes relativement anciennes telles que:

1° Celle de GRÉHANT [40], méthode type du premier groupe, qui est actuellement complètement tombée en désuétude en raison de sa faible précision et de ce qu'elle exige pour chaque dosage beaucoup trop de sang (30 cm³).

2° Celle dans laquelle on dose l'oxyhémoglobine par une solution convenable d'hyposulfite de sodium, selon le procédé indiqué par SCHUTZEMBERGER et RISSLER [118] pour doser l'oxygène; bien qu'elle soit très précise lorsqu'elle est correctement appliquée (28), cette méthode est cependant rarement utilisée car elle est peu pratique.

3° Celle de HALDANE [42], basée sur la dissociation de l'oxyhémoglobine par le vide et le ferricyanure de potassium, et s'appliquant à l'aide d'un petit appareil volumétrique approprié (29). Cette méthode est d'une assez grande exactitude, mais elle a l'inconvénient de nécessiter environ 25 cm³ de sang par dosage, ce qui est souvent gênant.

4° Celle de NICLOUX, dans laquelle on passe par l'intermé-

(28) Erreur relative moyenne de 1 % (LAMBLING [70]).

(29) Appareil mis au point par le même auteur.

diaire de la carboxyhémoglobine, le CO libéré étant dosé avec l'eudiomètre du même auteur [92]. Meilleure encore que celle de HALDANE (30), la présente méthode a malheureusement, elle aussi, le défaut de demander beaucoup de sang (20 à 25 cm³ par détermination).

II. — D'autre part, des méthodes utilisant « l'appareil volumétrique » de VAN SLYKE ou son « appareil manométrique » (perfectionnement du précédent), et qui par suite sont modernes, ces deux appareils n'ayant été inventés et mis au point qu'assez récemment [133, 134]. Les plus importantes d'entre elles sont :

1° Celle de LUNDSGAARD et MÖLLER [78], dans laquelle on mesure, grâce à l'appareil volumétrique, l'oxygène dégagé par 2 cm³ de sang sous l'action du vide et du ferricyanure de potassium.

2° Celle de VAN SLYKE et NEILL [136], simple amélioration de la précédente.

3° Celle enfin de VAN SLYKE et HILLER [135], utilisant de préférence l'appareil manométrique, et dans laquelle c'est un sang préalablement saturé non plus d'oxygène mais d'oxyde de carbone que l'on soumet à l'action du vide et du ferricyanure de potassium.

Toutes ces méthodes modernes présentent le gros intérêt d'être en même temps très pratiques — et cela, d'autant plus qu'elles ne demandent que 0,2 à 2 cm³ de sang par dosage — et d'une remarquable précision, leur précision atteignant en effet 0,25 % (d'après PETERS et VAN SLYKE [99]). Aussi, elles ont à peu près complètement supplanté les méthodes gazométriques anciennes.

Ce que nous venons de dire des méthodes gazométriques

(30) Elle ne donnerait pas, en effet, selon FONTÈS et THIVOLLE [38], plus de 2,5 % d'erreur.

modernes de dosage de l'hémoglobine les fait, de prime abord, apparaître comme idéales; rien n'est pourtant moins vrai en réalité.

En effet, ce que toutes les méthodes gazométriques, tant anciennes que modernes, dosent véritablement dans un sang, c'est la quantité maximum d'oxygène (où, ce qui revient au même, d'oxyde de carbone) que l'hémoglobine d'un volume donné de ce sang — 100 cm^3 par exemple — est capable, *in vitro*, de fixer; autrement dit, c'est, en toute rigueur, la « capacité respiratoire » de ce sang. Etant donné les propriétés de l'hémoglobine (voir pages 14 et 35), cette capacité respiratoire R devrait évidemment, quel que soit le sang considéré, correspondre exactement à l'hémoglobinémie H de ce sang; or, on s'est souvent rendu compte (de SAINT-MARTIN [116]) qu'en pratique cette correspondance n'était pas toujours assurée et que l'on pouvait n'avoir entre R et H qu'une proportionnalité variant selon les espèces animales et surtout selon les conditions physiologiques; aussi, comme l'a dit le premier de Saint-Martin (*loc. cit.*), « toute méthode de dosage de l'hémoglobine basée sur la détermination de la capacité respiratoire du sang peut être radicalement fausse ».

Toutefois, certains travaux plus récents tels que ceux de PETERS [100] et de FONTÈS et THIVOLLE [35], infirmant les observations précédentes, assurent que pour tout sang normal on aurait entre R et H une concordance absolue et répondant en particulier exactement à l'équivalence de la molécule d'oxygène (ou d'oxyde de carbone) à l'atome de fer. Quoi qu'il en soit, lorsqu'il s'agit de sangs pathologiques, le chromoprotéide sanguin pouvant être plus ou moins altéré, et par suite, pouvant avoir plusieurs de ses

propriétés modifiées (31), la phrase de de SAINT-MARTIN citée ci-dessus garde toute sa valeur comme on l'a reconnu notamment, dans l'anémie infectieuse (PTASZECK [106]). Remarquons néanmoins que pour FONTÈS et THIVOLLE [37] s'il est vrai que certaines méthodes gazométriques (et par exemple celle de HALDANE [42]) soient fréquemment inexactes lorsqu'on s'en sert pour déterminer l'hémoglobinémié des sangs anormaux, il n'en serait pas de même pour celle de NICLOUX [92] qui resterait très juste dans tous les cas; cette dernière méthode présente malheureusement, nous l'avons déjà signalé, l'inconvénient d'exiger beaucoup de sang.

En définitive on voit qu'il est toujours préférable de rejeter les méthodes gazométriques quelles qu'elles soient lorsqu'on veut mesurer une hémoglobinémié proprement dite, surtout si le sang n'est pas normal (32); par contre, lorsqu'on s'intéresse aux capacités respiratoires elles-mêmes, ainsi qu'il arrive souvent en physiologie, on doit autant que possible faire appel aux méthodes gazométriques modernes qui sont alors les méthodes par excellence.

Dans les recherches cliniques, le dosage de l'hémoglobine ayant surtout pour but de déceler les états anémiques et

(31) Sans qu'aucune de ces modifications porte, bien entendu, sur les valeurs f , car toute perte de fer par l'hémoglobine ne peut se produire qu'au prix de la destruction de ce chromoprotéide.

(32) Selon BICART [10], souvent le chromoprotéide sanguin arrive même jusqu'à présenter, dans le cas de sangs pathologiques, des anomalies de ses propriétés optiques. De ce fait, tout dosage d'hémoglobine réalisé par l'une quelconque des méthodes physiques est alors complètement faussé; par suite, toute méthode physique devrait également être écartée lorsqu'il s'agit de mesurer des hémoglobinémies proprement dites, et seules les bonnes méthodes ferrométriques seraient susceptibles de toujours en assurer l'exacte détermination.

d'en suivre l'évolution, les méthodes gazométriques seront donc à délaissier; seules, en effet, les modifications des hémoglobinémies proprement dites traduisent vraiment l'importance réelle de l'anémie.

§ III. — Méthodes basées sur le dosage du fer.

On sait (nous l'avons déjà rappelé page 12) que la proportion de fer trouvée à l'analyse de l'hémoglobine d'une espèce animale donnée est constante. On sait aussi que tout le fer existant dans le sang est, pratiquement, de nature hémoglobinique; en dehors du fer de l'hémoglobine, le sang ne renferme en effet que les proportions tout à fait négligeables de ce métal qui correspondent: pour une part, au « fer circulant plasmatique » — dont le taux n'atteint que 2 mg. par litre dans les appréciations les plus larges (FONTÈS et THIVOLLE [36], HENRIQUEZ et ROCHE [49] et ne dépasse même pas 0 mg. 2 par litre dans celles d'ABDERHALDEN et MÖLLER [3] —, et pour l'autre, aux infimes traces de fer que possèdent les leucocytes. Dès lors, on voit qu'il suffira de connaître le pourcentage f du fer dans l'hémoglobine d'un sang donné pour pouvoir déterminer par ferrométrie l'hémoglobinémie de ce sang.

Il y a longtemps que la teneur en fer f relative à chacune des principales espèces animales à hémoglobine a été établie avec une précision qui, d'abord assez relative, est rapidement devenue très suffisante pour permettre des dosages d'hémoglobine corrects; aussi, on a fréquemment dosé le chromoproteide sanguin de ces espèces par ferrométrie et les méthodes préconisées pour ce faire abondent dans les publications. Naturellement, comme on ne dispose toujours du matériel sang que d'une façon limitée, et com-

me la proportion du fer dans ce matériel est relativement très faible, ces méthodes consistent toutes en des microdosages du fer.

On a décrit pour le fer bien des microdosages (33). Beaucoup ont été adaptés à l'étude des substances organiques, mais l'on n'en a appliqué qu'un nombre assez restreint aux recherches biologiques et plus particulièrement à la mesure des hémoglobinemies; ce sont les plus importantes de ces dernières applications que nous allons envisager dans le présent paragraphe.

Les méthodes de dosage de l'hémoglobine par ferrométrie n'ayant été rendues possibles que par la connaissance exacte des pourcentages f , il nous a paru bon de rassembler ici dans un tableau (tableau I) tous ceux dont nous avons

TABLEAU I

Espèce animale	f (pourcentage du fer dans l'hémoglobine)	Source de l'indication
Espèce humaine ..	0,42	Lambling [70]
(idem	0,42 à 0,43	Jolly [60]
Cheval	0,36	Letsche [76]
Bœuf	0,40	Hüfner [56]
Chèvre	0,39	Lapicque [72]
Porc	0,43	Otto [96]
Chien	0,34	Jacquet [58], Lapicque [72]
Chat	0,35	Aberhalden [1]
Ecureuil	0,59	Hoppe-Seyler (1)
Cobaye	0,48	Hoppe-Seyler [50]
Souris	0,49	Hoppe-Seyler [50]
Oie	0,51	Abderhalden et Medigreceanu [2]
Coq	0,34	Jacquet [58]

(1) Donnée rapportée par Lambling [71] dans l'Encyclopédie chimique de Frémy.

(33) Dont on trouvera les plus importants rappelés dans un intéressant travail de Mme MOUSSERON [87].

pu relever la valeur exacte (telle qu'elle ressort, du moins, des connaissances actuelles); nous avons aussi indiqué dans ce tableau la source de chacun des coefficients f donnés, afin, le cas échéant, de faciliter tout contrôle au lecteur. Bien entendu, ce sont uniquement les valeurs notées dans ce tableau que nous avons considérées et utilisées par la suite.

**

D'après la classification habituelle des méthodes de microdosage du fer, les méthodes de dosage de l'hémoglobine par ferrométrie se divisent en:

- A) Méthodes gravimétriques;
- B) Méthodes volumétriques;
- C) Méthodes colorimétriques;
- D) Méthodes potentiométriques.

A. — *Méthodes gravimétriques.*

La seule méthode gravimétrique de microdosage du fer que l'on ait essayé d'employer dans le cas du sang est celle de NICLOUX et WELTER [93] dans laquelle, après avoir calciné la prise d'essai du sang étudié en présence d'oxygène afin de transformer son fer en oxyde ferrique, on détermine, à l'aide d'une microbalance, la diminution de poids correspondant à la réduction de cet O^3Fe^2 par un courant d'hydrogène agissant à la température du rouge sombre, diminution qui permet de calculer le résultat.

Nous dirons seulement de cette méthode qu'elle est inexacte dans le cas du sang, par suite notamment (M^{me} MOUSSERON [87]) d'une volatilisation de chlorure de so-

dium à la température nécessaire pour la réduction de l'oxyde ferrique.

B. — *Méthodes volumétriques.*

On ne peut songer, et l'on n'a effectivement jamais songé, à étendre au microdosage du fer plusieurs des méthodes habituelles de sa macroanalyse volumétrique en raison de la difficulté, ou même de la quasi-impossibilité, présentée par leur adaptation aux nécessités de la microanalyse. Ainsi, nous n'avons pas relevé de microdosage de fer par le bichromate de potassium (34) ou le chlorure stanneux (35).

Il existe néanmoins pour Fe de nombreuses méthodes volumétriques de microdosage. Parmi celles qu'on peut appliquer au cas du sang, les plus connues sont, par ordre chronologique, celles de MOREAU, de NEUMANN, de KNECHT et HIBBERT, de FONTÈS et THIVOLLE, et enfin de MOUSSERON et Mlle CROS.

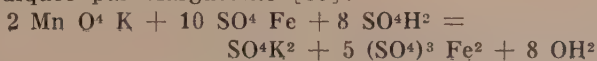
I. — *Méthode de MOREAU [84] :*

Elle constitue simplement une adaptation de la manganimétrie classique du fer (36) au microdosage de ce métal dans des matériaux organiques. En effet, dans cette mé-

(34) Comme dans la macrométhode de PENNY.

(35) Comme dans la macrométhode de FRESSENIUS.

(36) Manganimétrie qui, comme on le sait, est basée sur la réaction indiquée par Margueritte [83] :



thode, on commence par minéraliser la prise d'essai de sang dans une capsule en platine par l'action, au rouge sombre, d'un mélange de nitrate de potassium, de carbonate de potassium, et de carbonate de sodium anhydres secs; on reprend ensuite par l'eau et on filtre, ce qui permet la séparation du fer à l'état de résidu insoluble de sesquioxyde et de carbonate de fer. Après lavage complet à l'eau chaude de ce résidu, on le dissout dans l'acide chlorhydrique, on chasse cet acide par SO^4H^2 à chaud, on réduit par le zinc pur le sulfate ferrique formé, et on dose enfin par

$\text{MnO}^4 \text{K} \frac{\text{N}}{100}$ le fer ferreux ainsi obtenu.

La méthode de MOREAU présente divers inconvénients. En particulier, comme l'auteur lui-même le reconnaît, la minéralisation au rouge sombre est très délicate à conduire et s'accompagne généralement de projections; de plus, le lavage à l'eau chaude provoque des pertes en fer (probablement par passage à l'état de « sol » d'une partie du résidu de sesquioxyde et de carbonate), pertes qu'on met facilement en évidence dans le filtrat par la réaction du sulfo-cyanure ferrique; enfin, il est très difficile de se procurer du zinc totalement exempt de fer (DOMINICI [25]), et de ce fait, la réduction par Zn risque d'entraîner un apport — relativement important ici — de fer étranger. Dans ces conditions, lorsqu'on veut doser l'hémoglobine de façon tant soit peu précise, la méthode de MOREAU ne peut être utilisée; aussi, elle est tombée en complète désuétude, d'autant plus qu'il ne manque pas de moyens plus simples pour déterminer les hémoglobinémies avec une exactitude pareille à la sienne.

2. — *Méthode de NEUMANN* [89, 90] :

Dans cette méthode, on détruit complètement la prise d'essai de sang — ou, plus généralement, de la substance organique étudiée — selon le procédé de l'auteur (kjeldahlisation par le mélange nitro-sulfurique à parties égales) ; le fer passe ainsi entièrement à l'état ferrique ; en présence des phosphates qui l'accompagnent, il est alors précipité par le zinc en milieu ammoniacal. Après séparation et lavage convenable, le précipité est traité sur le filtre par l'acide chlorhydrique et le chlorure ferrique obtenu est enfin dosé par iodométrie suivant la technique de MOHR (c'est-à-dire, par action sur un excès d'iodure alcalin — ce qui donne la réaction :

$2 \text{Fe}^{+++} + 2 \text{I}^- \rightleftharpoons 2 \text{Fe}^{++} + \text{I}_2$ — et dosage de la quantité d'iode libérée par cette action au moyen d'une solution d'hyposulfite de sodium).

Pas plus que celle de MOREAU, la méthode de NEUMANN n'est exempte d'inconvénients. Ainsi, DOMINICI [25] a montré :

a) Que le fer n'était précipité que dans des conditions très étroites, donc délicates à réaliser ;

b) Que la séparation de ce métal par l'intermédiaire du précipité phosphato-zincique ammoniacal n'était d'ailleurs jamais quantitative, comme on peut le vérifier en recherchant Fe (37) dans le liquide séparé de ce précipité ;

c) Enfin, que l'emploi, ici, d'une solution d'hyposulfite de

(37) Par la réaction du sulfocyanure ferrique, par exemple.

sodium de titre très faible (38), d'où très altérable, constitue une cause permanente d'erreurs.

Par suite, la présente méthode n'est pas plus précise que la précédente.

Dans le but d'accroître la valeur de la méthode de NEUMANN, de nombreux auteurs parmi lesquels ARON [5], QUECKENSTEDT [107], BUTTERFIELD [17], LINTZELL [77], GREY [41], etc..., lui ont apporté des modifications parfois importantes; malheureusement, ces modifications laissant toujours subsister, dans une certaine mesure, la plupart des inconvénients de la méthode type, elles n'ont pas atteint le but envisagé. En définitive, toute méthode de détermination des hémoglobinémies basée sur le dosage du fer par l'iodométrie devra aussi être rejetée si l'on recherche quelque exactitude.

3. — *Méthode de KNECHT et HIBBERT* [64]:

Elle consiste à amener le fer de la prise d'essai de la substance étudiée à l'état de chlorure ferrique et à le doser alors à l'aide d'une solution titrée de chlorure titaneux, en présence de sulfocyanure d'ammonium comme indicateur. La réaction quantitative utilisée ici est la suivante:



Le chlorure titaneux étant excessivement oxydable, ces dosages doivent se faire entièrement à l'abri de l'air (grâce à une atmosphère de gaz carbonique par exemple); de plus,

(38) Faible titre rendu nécessaire par la destination même de cette solution.

il y a lieu de vérifier exactement avant chacun d'eux le titré de la solution titaneuse à l'aide d'une solution étalon bien stable de chlorure ferrique.

La réaction (I) est très sensible et permet de retrouver jusqu'à un centième de milligramme de fer; aussi, la méthode de KNECHT et HIBBERT donne les hémoglobinémies avec beaucoup de précision lorsqu'elle est correctement appliquée. Dans des conditions, de nombreux auteurs (notamment, HENRIQUEZ et ROCHE [49], BARCROFT et ses élèves, etc...) ont dosé l'hémoglobine par l'intermédiaire du chlorure titaneux, ce qui les a toujours satisfaits.

On peut donc considérer la méthode de KNECHT et HIBBERT comme une bonne méthode de dosage du chromoprotéide sanguin; mais, on ne devra pas moins renoncer à son emploi toutes les fois que la question de commodité interviendra, en raison de la nécessité où l'on se trouve d'effectuer les dosages de chlorure ferrique à l'abri de l'air par suite de la grande oxydabilité du chlorure titaneux.

4. — *Méthode* de FONTÈS et THIVOLLE:

Cette méthode, dont la description est répartie dans plusieurs mémoires [33, 34, 35], constitue une application de la molybdo-manganimétrie du fer (39).

(39) On sait que le principe de la molybdo-manganimétrie du fer est le suivant:

Lorsqu'on ajoute à une solution d'anhydride molybdique dans un excès d'acide phosphorique (solution incolore) un réducteur tel que Fe métallique ou qu'un sel ferreux, on aboutit à la réduction quantitative de O^3Mo en divers sous-oxydes de molybdène plus ou moins bleus et notamment en bioxyde, cependant que le fer passe entièrement à l'état ferrique Fe^{III} . Si l'on verse alors dans le mélange une solution de permanganate, M , on réoxyde aussitôt les dérivés molybdeux et quand la coloration bleue a complètement disparu et qu'aucun excès de permanganate n'a encore donné de coloration rose, la totalité des sous-oxydes précédemment formés se trouve revenue à l'état d' O^3Mo .

Dans cette application, on minéralise le fer de 1 cm³ du sang étudié par action de l'acide nitrique, puis par fusion avec du nitrate de magnésium; on dissout ensuite ce fer dans NO³H, neutralise par l'ammoniaque, et réacidifie légèrement; ceci fait, Fe^{III} est réduit à l'état ferreux par l'hydrosulfite de sodium et précipité à l'état de (C¹⁰H⁶O NO)²Fe par une solution acétique d' α nitroso β naphthol (40). Ce précipité, une fois séparé et lavé convenablement à l'acide acétique, est complètement incinéré dans un micro-four de PREGL (41), ce qui transforme tout son fer en O³Fe²; on réduit alors au rouge sombre par de l'hydrogène purifié sec l'oxyde ferrique ainsi obtenu et fait agir le résidu sur du réactif phospho-molybdique cuivré (l'action catalytique du

L'action oxydante du permanganate étant due à la réaction:
 $\text{OH}^2 + 2\text{O}^4\text{Mn} = 20 \text{ Mn} + 5 \text{ O} + 2 \text{ HO}-$, on voit facilement que dans
 $\frac{3 \text{ O}^4 \text{ Mn}}{5}$
 les réactions précédentes un Fe métallique correspond à

puisqu'il fixe $\frac{\text{O}^3}{2}$, et qu'un Fe^{II}, fixant seulement $\frac{\text{O}}{2}$, correspond
 $\frac{\text{O}^4\text{Mn}}{5}$
 à

On réalise par suite le dosage du fer métallique ou ferreux ajouté au réactif phospho-molybdique en prenant comme solution *M* une solution de titre connu et en ne l'ajoutant au mélange que jusqu'à exacte décoloration.

(40) Réaction indiquée par ILINSKI et KNORRE [57].

(41) Ce micro-four consiste simplement en un segment de tube de verre peu fusible *T* dont une extrémité porte un tube de diamètre inférieur coudé à angle droit et orientable, l'extrémité libre de *T* étant munie d'une petite nacelle en porcelaine ou en platine dans laquelle on place le précipité à incinérer.

cuivre facilitant la réduction du réactif phospho-molybdique par le fer réduit et évitant de la sorte tout dégagement d'hydrogène par attaque phosphorique); enfin, on dose l'oxygène absorbé par une solution de permanganate de potassium de titre très faible qu'on a soin de vérifier, avant tout usage, avec une solution étalon de sel de MOHR stabilisée par addition d'une légère proportion d'acide phosphorique (42).

Dans les limites où son étalon de sel de MOHR reste stable, la méthode de FONTÈS et THIVOLLE est précise; en effet, les erreurs relatives qu'elle comporte ne dépassent pas 2,5 %, ou même 1,5 % dans les dosages particulièrement bien conduits, comme ces auteurs ont pu l'indiquer après en avoir longtemps fait usage [38]. Cette méthode ne met de plus en œuvre que des moyens simples. Malheureusement, en raison de la difficulté relative de quelques-unes de ses manipulations (43) et de sa longueur, elle n'est pas d'une grande commodité.

On a cherché à simplifier la méthode de FONTÈS et THIVOLLE pour la rendre plus pratique et plus courte. FLEURY et MARQUE [31] y sont parvenus en lui apportant les quelques modifications suivantes: ils partent non plus de 1 mais de 3 cm³ des sangs à étudier et, après avoir, comme précédemment, amené tout le fer de ces prises d'essai à l'état de

(42) Mieux vaudrait remplacer une telle solution par exemple par une solution d'oxalate de sodium, solution qui, selon SÖRENSEN [120], serait beaucoup plus stable que l'étalon de FONTÈS et THIVOLLE.

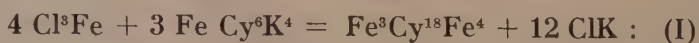
(43) Et notamment, de la transformation du fer du précipité de ferro-nitroso β naphthol en O^3Fe^2 , cette transformation n'étant entièrement obtenue que par l'envoi dans le micro-four de PREGL d'un courant d'oxygène sans lequel l'incinération resterait incomplète (DOMINICI [25]).

nitrate ferrique par minéralisation et dissolution du résidu dans l'acide nitrique, ils réduisent entièrement ce nitrate par le mercure et l'acide chlorhydrique, selon la technique de LEROY, CAY et ANDERSON [74], ce qui demande à peine cinq minutes; ceci fait, ils débarrassent soigneusement, le cas échéant, la solution de nitrate ferreux ainsi obtenue de tout l'hydrogène qu'elle peut renfermer et la soumettent enfin directement à la molybdo-manganimétrie.

Ce nouveau mode opératoire, tout en gardant les qualités de celui de FONTÈS et THIVOLLE, est d'une commodité très supérieure. Aussi, lorsqu'on a recours à lui pour déterminer les hémoglobinemies par molybdo-manganimétrie, on peut considérer que l'on utilise l'une des meilleures méthodes de dosage du chromoprotéide sanguin; nous devons toutefois constater que même en suivant ce dernier mode les dosages d'hémoglobine restent un peu longs et délicats en raison de la façon dont le sang est minéralisé et des difficultés qu'il y a à bien conduire les réductions.

5. — *Méthode de MOUSSERON et Mlle CROS* [86] :

Dans l'application de cette méthode au cas du sang, on incinère 1 centimètre cube du sang étudié à basse température, reprend les cendres par ClH , puis par l'eau, en évaporant chaque fois; on redissout ensuite dans l'eau. Le fer étant ainsi passé à l'état de chlorure ferrique, on le précipite par le ferrocyanure de potassium à l'état de bleu de Prusse, dérivé totalement insoluble en présence d'électrolytes, selon la réaction :



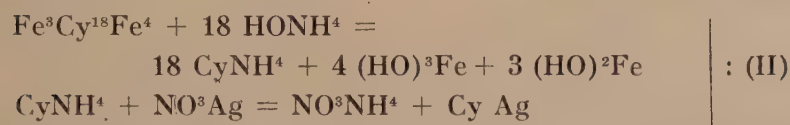
Enfin, on dose ce précipité après l'avoir soigneusement séparé et lavé avec une solution faible de nitrate de potas-

sium (pour éviter qu'il ne passe en partie à l'état de « sol »), ce qui permet d'établir la correspondance en fer et en hémoglobine.

Pour réaliser ce dosage de bleu de Prusse, MOUSSERON et Mlle CROS indiquent deux moyens:

a) On transforme, dans des conditions appropriées, tout l'azote du précipité en N ammoniacal par microkjeldahlisation sulfurique, et on détermine simplement la quantité d'azote ainsi obtenue selon le procédé de PARNAS et WAGNER.

b) On décompose à l'ébullition le ferrocyanure ferrique par l'ammoniaque en présence d'une quantité connue convenable d'une solution titrée de nitrate d'argent; on obtient ainsi les réactions:



Après refroidissement, il suffit alors d'acidifier par l'acide azotique, en continuant à refroidir, et de doser le nitrate d'argent restant par la méthode classique de VOLHARD-CHARPENTIER pour pouvoir calculer, grâce aux réactions (II), le résultat cherché.

De ces deux moyens, il semble préférable, pour plus d'exactitude, de n'utiliser que le premier car le second est plus susceptible d'entraîner des erreurs, notamment par décomposition — surtout lorsqu'on refroidit insuffisamment — d'une partie du cyanure d'argent par l'acide nitrique.

Quoi qu'il en soit, telle qu'elle est appliquée au sang, la présente méthode nous paraît présenter un petit inconvénient tenant au mode de minéralisation adopté; en effet (DOMINICI [25]), aussi basse que soit la température atteinte lorsqu'on incinère du sang, une telle manipulation risque toujours d'être à l'origine de pertes en fer notables en provoquant la volatilisation soit de chlorure ferrique formé

grâce au ClNa sanguin, soit de fer-carbonyle engendré à l'aide de l'oxyde de carbone qui prend naissance entre temps. Par contre, avec une technique de minéralisation mieux choisie — celle de NEUMANN par exemple — la méthode de MOUSSERON et Mlle CROS devient, surtout si l'on dose le précipité de ferrocyanure ferrique par le premier moyen indiqué, l'une des plus précises pour déterminer les hémoglobinémies; malheureusement, en raison de la destruction complète du sang que de toute façon elle nécessite, elle n'est pas des plus rapides.

C. — *Méthodes colorimétriques.*

Elles comprennent:

I. — Des méthodes dans lesquelles le dosage colorimétrique de l'hémoglobine est basé sur l'obtention, grâce à un sulfocyanure alcalin, de sulfocyanure ferrique dont on connaît l'intense coloration rouge-sang, ou d'un complexe voisin encore plus coloré.

II. — Des méthodes où l'on emploie la coloration de divers autres composés du fer et notamment de certains de ses complexes organiques.

I. — *Méthodes utilisant le sulfocyanure ferrique ou le complexe voisin:*

Dans toutes ces méthodes, on minéralise d'abord suffisamment la prise d'essai du sang étudié pour que tout son fer passe à l'état de solution de Fe^{111} minéral; on débarrasse alors cette solution de tout élément gênant pour la suite du dosage et l'on en prend une partie aliquote sur laquelle

on produit, de façon convenable, l'action d'un sulfocyanure alcalin. Il ne reste plus, dès lors, qu'à faire la comparaison colorimétrique de la coloration ainsi obtenue avec celle donnée, dans des conditions comparables, par un volume connu de solution ferrique étalon appropriée pour pouvoir calculer l'hémoglobinémie du sang considéré.

De nombreux facteurs influent, d'une part, sur la formation du sulfocyanure ferrique ou du complexe encore plus coloré (complexe de formule: $(\text{NCS})^3 \text{Fe}$, 9 NCS) qui en dérive, d'autre part, sur la stabilité de ces composés, et partant, de la coloration qui les caractérise.

Dès 1895, LAPICQUE [72] en indiquait un certain nombre; mais, ce n'est qu'assez récemment, et grâce à de nombreux travaux, que l'on a pu parvenir à en connaître l'ensemble.

Ainsi:

— ROSENHEIM et COHN [113] ont montré qu'en milieu neutre le sulfocyanure ferrique était rapidement hydrolysé, d'où perdait de sa coloration, tandis que cet inconvénient était relativement évité en milieu acide;

— OSTWALD [95] a fait remarquer qu'en solution le rhodanate de fer était évidemment d'autant moins hydrolysé que les ions (NCS) --- étaient en plus grand excès, donc que l'on avait avantage à réaliser une forte concentration en sulfocyanure alcalin pour faire les dosages;

— LUNGE [79] a reconnu que le sulfocyanure ferrique se dissolvait à l'état non dissocié dans l'oxyde d'éthyle (44) ainsi que dans l'alcool amylique, l'alcool isoamylique, l'acétate d'amyle, et l'acétone, et que la simple addition d'acétone à

(44) Propriété utilisée pour déceler des traces de fer, le coefficient de partage du $(\text{NCS})^3 \text{Fe}$ entre l'oxyde d'éthyle et l'eau étant très en faveur de l'oxyde d'éthyle.

une solution aqueuse de ce sel favorisait sa non dissociation;

— WILLSTATTER [142] et de LACHS et FRIEDENTHAL [69] ont étudié quelques faits moins importants;

— Enfin, VON HEDENSTRÖM et KERNAN [46], de BROUCKÈRE et GILLET [14], et SZEGÖE et CASSONI [124, 125] ont fait connaître l'action empêchante que certains corps — les phosphates par exemple — présentaient, à partir d'un certain taux, relativement à la formation du sulfocyanure ferrique non dissocié ou du complexe $(\text{NCS})^3 \text{Fe}$, 9NCS ; ils ont de plus précisé le mécanisme intime de cette action et surtout les conditions régissant la formation du complexe plus coloré et sa stabilité ultérieure (45).

Les premières en date des méthodes de dosage de l'hémoglobine par colorimétrie d'un composé sulfocyanhydrique du fer — celles de LAPICQUE [73], de KÖNIG [66], et quelques autres —, antérieures à la plupart des travaux ci-dessus, ne pouvaient évidemment en tenir compte; aussi, aucune n'était très précise et elles sont toutes rapidement tombées en discrédit.

Par contre, celles publiées au cours de ces vingt dernières années et que nous distinguerons sous le nom de « méthodes colorimétriques modernes » sont des méthodes beaucoup plus exactes.

Ces méthodes modernes sont nombreuses mais ne diffèrent pratiquement les unes des autres qu'en ce qui concerne le mode de minéralisation du sang et la façon dont est réalisée l'action des sulfocyanures alcalins; les plus connues sont:

(45) Ce complexe étant sujet, comme le sulfocyanure ferrique, à être dégradé par hydrolyse avec perte de coloration.

— celle de LACHS et FRIEDENTHAL [69], dans laquelle le sang est, à tort, incinéré, et qui n'est d'ailleurs, plus exactement, qu'une méthode chromoscopique;

— celle de BERMAN [8], dans laquelle le sang est traité par l'acide bromhydrique à 34 % et le permanganate de potassium O, I N;

— celle de KUGELMASS [67], dans laquelle est utilisée l'action oxydante du perhydrol en milieu chlorhydrique et l'influence de l'alcool isoamylique sur l'hydrolyse du ferrocyanure ferrique;

— la première méthode de WONG [143], réalisant la destruction du sang par $\text{ClH} + \text{ClO}^{\text{K}}$;

— celle de RONCATO [112], qui est plutôt une méthode spectrophotométrique;

— celle de DONATH [27] qui emploie la technique de destruction de NEUMANN;

— celle de SMITH et COOK [119] qui ont recours à l'alcool amylique et à l'oxyde d'éthyle, et celle de MURMERY [88], très voisine;

— celle de VALDEMAR et ROCHE [132] qui font une destruction sulfurique du sang;

— celle de DUPRAY-MARTIN [28], utilisant le mélange nitro-perchlorique;

— celle de FOWWEATHER (46) qui traite le sang par le perhydrol et l'acide sulfurique et qui fait agir le sulfocyanure d'ammonium en solution très concentrée et en présence d'acétone;

— enfin, la deuxième méthode de WONG [144], dont les agents de minéralisation sont l'acide sulfurique et le per-

(46) D'après la description qu'en donne DOMINICI [26].

sulfate de potassium, et dans laquelle la coloration est obtenue, toujours en présence d'acétone, par le sulfocyanure de potassium concentré.

La coloration du sulfocyanure ferrique non dissocié et surtout celle du complexe $(\text{NCS})^3 \text{Fe}$, 9NCS sont si intenses qu'elles permettent de déceler le fer à la dilution de 1/1.000.000 selon BUNGE, de 1/20.000.000 selon KAHANE [62], et même de 1/50.000.000 selon LACHS et FRIEDENTHAL [69].

Aussi, les méthodes colorimétriques modernes qui d'une part tiennent un compte suffisant des facteurs influant sur la formation et la stabilité des corps colorés précédents, et qui d'autre part satisfont à toutes les conditions imposées par l'utilisation correcte de la colorimétrie (conditions rappelées pages 23-24), sont des méthodes très précises; c'est ainsi que la deuxième méthode de WONG [144] permet, d'après son auteur, de déterminer les hémoglobinémies avec une précision de 2 %, plusieurs autres méthodes voisines, et notamment celle de FOWWEATHER (47), ne donnant pas plus de 2,5 ou de 3 pour cent d'erreur.

Bien entendu, pour que des méthodes colorimétriques modernes puissent parvenir à une telle précision, il est nécessaire que la solution ferrique étalon qu'elles utilisent soit stable; c'est bien le cas dans les deux méthodes précitées, l'étalon employé par FOWWEATHER étant une solution titrée de sulfate ferreux ammoniacal complètement oxydé par MnO^4K en présence d'un excès d'acide sulfurique, et celui dont se sert WONG étant une solution titrée d'alun de

(47) Voir note (46), page 55.

fer et d'ammonium, légèrement acidulée pour plus de sécurité.

En définitive, parmi les méthodes de dosage de l'hémoglobine que nous venons de considérer, deux, celle de FOW-WEATHER et surtout la deuxième de WONG — seule méthode de cet auteur que nous aurons désormais en vue —, sont particulièrement précises (48) ; elles sont aussi, en raison surtout de la minéralisation simplifiée dont elles s'accommodent, particulièrement pratiques et rapides, et cela au point que leur application demande au maximum 15 à 20 minutes DOMINICI [25]) ; enfin, elles n'exigent pour tout appareil qu'un bon colorimètre. Ce sont donc deux méthodes très recommandables et dont la valeur justifie la place importante qu'elles ont déjà pris en chimie biologique.

II. — *Autres méthodes de dosage de l'hémoglobine par colorimétrie du fer :*

Le fer donnant naissance à de multiples complexes colorés, notamment en chimie organique, on a pu mettre au point, en dehors des précédentes, bien d'autres méthodes colorimétriques de microdosage de ce métal.

Parmi ces méthodes, celles qui ont été appliquées au cas du sang restent toutefois en fort petit nombre ; pour ne citer que les meilleures, nous rappellerons seulement :

1° Celle de DENIGÈS [24], basée sur la coloration jaune que prennent les solutions très diluées de perchlorure de

(48) Leur précision n'atteignant peut-être pas, toutefois, celle des bonnes méthodes volumétriques.

fer quand on les enrichit convenablement en acide chlorhydrique (49).

2° Celle de TUKATS [131], basée sur la coloration pourpre qui se développe lorsqu'on fait agir, en milieu alcalin, l'acide thioglycolique sur un sel de fer.

Ces deux méthodes n'étant pas d'une parfaite exactitude et ne présentant aucune supériorité sur des méthodes telles que celles de WONG ou de FOWWEATHER, nous n'en parlerons pas davantage.

D. — *Méthodes potentiométriques.*

Quelques auteurs, et en particulier KING et HOWARD [63] et MAC FARLANE [80], se sont enfin adressés à la potentiométrie du fer pour déterminer les hémoglobinémies, potentiométrie qu'ils ont réalisée, de façon classique, à l'aide d'une solution très diluée de sulfate titaneux. Mais, les méthodes correspondantes nécessitant la possession et l'utilisation d'un bon potentiomètre sans que leur valeur dépasse celle de bien des méthodes plus simples, elles ne sont pratiquement pas employées.

(49) Une concentration de 26 à 28 pour cent en ClH donnant l'intensité de coloration maximum.

CHAPITRE III

LE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE PAR LA METHODE DE WONG

UN NOUVEAU MODE OPERATOIRE; SA VALEUR

§ 1. — LA METHODE DE WONG; SA PRÉCISION RÉELLE

Les méthodes de dosage de l'hémoglobine qui sont à la fois précises et susceptibles d'un emploi courant dans un laboratoire de chimie clinique sont peu nombreuses; en effet, on ne peut guère considérer comme telles que certaines méthodes ferrométriques, et notamment celles de FONTÈS et THIVOLLE [33, 34, 35], de MOUSSERON et Mlle CROS [86] (50), de FOWWEATHER (2), et de WONG [144].

Parmi celles-ci, la méthode de WONG est celle qui paraît plus particulièrement convenir en raison de sa rapidité, de sa simplicité de moyens, et de la précision de 2 % que son auteur lui attribue; aussi, lorsque nous avons voulu doser l'hémoglobine de façon pratique et précise, nous avons envisagé d'y recourir.

(50) Moyennant, toutefois, l'adoption d'un mode de minéralisation convenable.

(51) Voir note (46), page 55.

Le principe et les détails du mode opératoire de la méthode de WONG sont les suivants :

A. — *Principe :*

« On sépare le fer de la molécule d'hémoglobine par l'action de l'acide sulfurique concentré, employé comme il l'est d'ordinaire dans la préparation de l'hématoporphyrine acide, la décomposition étant facilitée grâce à du persulfate de potassium.

Les protéides sont alors précipités par l'acide tungstique et filtrés; le procédé ne comportant pas d'ébullition, la concentration de l'acide dans l'inconnu peut être contrôlée et établie identique à celle utilisée pour la production de la réaction colorée dans le cas de l'étalon. Par l'action du sulfocyanure de potassium, on fait enfin passer le fer à l'état de sulfocyanure ferrique, composé sur lequel porte le dosage colorimétrique, en opérant en présence de persulfate de potassium qui empêche toute réduction à l'état ferreux ».

B. — *Mode opératoire :*

« Mettre, dans un ballon jaugé de 50 cm³, exactement 0 cm³,5 du sang étudié (sang défibriné) puis 2 cm³ d'acide sulfurique concentré exempt de fer; mélanger en imprimant à l'ensemble, pendant une à deux minutes, un mouvement de rotation. Additionner de 2 cm³ d'une solution aqueuse saturée de persulfate de potassium pur et agiter.

Diluer jusqu'à environ 25 cm³ avec de l'eau distillée et introduire dans le flacon 2 cm³ d'une solution aqueuse à 10 % de tungstate de sodium exempt de fer; mélanger; refroidir à la température ambiante sous le robinet et diluer ensuite exactement jusqu'à 50 cm³ avec de l'eau distillée.

Boucher hermétiquement le flacon et le renverser deux

ou trois fois pour réaliser un parfait mélange. Filtrer le précipité tungstique ainsi obtenu, à travers un papier filtre sec, dans un récipient sec et propre; pipeter exactement 20 cm³ de filtrat limpide dans un grand tube à essai gradué à 20 et 25 cm³.

Mesurer, dans un tube à essai semblable, exactement 1 cm³ d'une solution étalon d'alun de fer et d'ammonium contenant 0 mg, 1 de fer par cm³ (52); additionner exactement — au moyen d'une pipette de 1 cm³ graduée en dixièmes — de 0 cm³, 8 de l'acide sulfurique précédemment utilisé et diluer avec de l'eau distillée juste jusqu'à la marque 20 cm³, en refroidissant à la température ambiante sous le robinet.

Additionner alors tant l'inconnu que l'étalon de 1 cm³ de la solution de persulfate de potassium saturée et de 4 cm³ d'une solution appropriée de sulfocyanure de potassium (53). Boucher avec des bouchons propres en caoutchouc, mélanger, enfin comparer au colorimètre de Dubosq.

Les 20 cm³ de filtrat représentant 0 cm³, 2 du sang initial, et la quantité de solution étalon employée contenant 0 mg, 1 de fer, le résultat cherché, exprimé en fer, sera:

$$X_{Fe} = \frac{h_x}{h_e} \times 50 \quad ; (I)$$

(X_{Fe} représentant le nombre de milligrammes de fer renfermés dans 100 cm³ du sang étudié, h_e la hauteur de lecture correspondant à la solution étalon, et h_x celle correspondant à l'inconnu) ».

(52) Solution aqueuse à 0 g. 863 d'alun de fer et d'ammonium cristallisé pur et à 2 cm³ d'acide sulfurique concentré exempt de fer pour 1.000 cm³ (WONG [144]).

(53) Solution aqueuse 3 N en sulfocyanure de potassium et à 4 % d'acétone pure (WONG [144]).

Dans les dosages d'hémoglobine selon la méthode de WONG, au lieu de laisser les résultats sous la forme ci-dessus, on les exprime souvent en « capacités respiratoires ». Pour cela, il suffit de multiplier le rapport (I) par $\frac{22.400}{55.840} = 0,4$

puisque la quantité d'hémoglobine qui renferme 55.840 mg de fer, c'est-à-dire un atome-gramme de ce métal, correspond théoriquement à une molécule-gramme d'oxygène, donc (à 0° et sous 670 mm de mercure) à 22.500 cm³ de ce gaz; autrement dit, on applique alors la formule:

$$XO^2 = \frac{h_o}{h_x} \times 20 \quad : (II)$$

qui donne le nombre maximum de cm³ d'oxygène (ramené aux conditions normales) que théoriquement 100 cm³ du sang étudié sont capables d'absorber.

Cette deuxième façon d'exprimer les résultats n'est pas recommandable puisque, nous l'avons vu (pages 38 et 39), la proportionnalité n'est pas toujours assurée entre la « capacité respiratoire » réelle et l'hémoglobininémie, donc la teneur en fer, d'un sang donné.

Il est, par contre, logique de transformer les taux de fer X_{Fe} donnés par l'équation (I) en taux d'hémoglobine X_{Hb} . Naturellement, ceci ne peut être fait que quand on connaît exactement f pourcentage du fer dans l'hémoglobine de l'espèce animale dont le sang est étudié; mais, nous savons que cette condition est presque toujours remplie. Le passage au taux d'hémoglobine est donc généralement possible; on le réalise alors en utilisant l'équation:

$$X_{\text{Hb}} = \frac{X_{\text{Fe}}}{10 f} : (\text{III})$$

qui donne les taux X_{Fe} exprimés en grammes d'hémoglobine pour 100 cm³ de sang.

En ce qui nous concerne, c'est, bien entendu, selon ce dernier mode X_{Hb} que nous exprimons les hémoglobinémies lorsque nous connaissons les teneurs f correspondantes ; toutefois, il nous arrive aussi d'en rester à la notation X_{Fe} . D'autre part, c'est cette notation X_{Fe} , à l'exclusion de la notation XO^2 , que nous utilisons quand une teneur f nous est imparfaitement connue.

*
**

Avant d'adopter la méthode de WONG [144], nous avons voulu en vérifier l'exactitude.

Dans ce but, nous l'avons appliquée à des solutions d'alun de fer et d'ammonium de titre connu et à plusieurs prises d'essai (toujours de 0 cm³, 5) de mêmes sangs. Bien que suivant rigoureusement son mode opératoire, nous ne pûmes ainsi parvenir à la précision de 2 % annoncée par WONG; en effet, avec les solutions d'alun, nos chiffres s'éloignaient constamment de ce qu'ils auraient dû être, et avec les sangs, nous observions entre les valeurs trouvées pour une même hémoglobinémie au cours des divers dosages des écarts maxima eux aussi supérieurs à 2 %. Nous avons d'ailleurs résumé ces résultats dans le tableau II en mettant en évidence les différences avec le chiffre théorique ou les différences maxima constatées.

TABLEAU II

Matériel étudié	Fer dosé (en mg. pour 100 cm ³)	Différences (rapportées à 100 mg. de fer)	
Solution d'alun de fer et d'ammonium à 50 mg. de fer par 100 cm ³ ..	{ 55,0 53,4 54,6	{ +10,0 +6,8 +9,2	avec le chiffre théorique
Solution d'alun de fer et d'ammonium à 30 mg. de fer par 100 cm ³	{ 33,8 34,8	{ +12,6 +16,0	
Sang de bœuf	{ 51,2 49,3 48,9	{ — 3,7 4,5	maxima
Sang de porc	{ 56,2 59,1	{ — 5,1	
Sang humain d'anémique	{ 40,2 41,8 41,2	{ — 4,0 2,5	

De tels résultats ne peuvent s'expliquer que par quelques points faibles du mode opératoire de WONG; aussi, ce n'est qu'après avoir convenablement transformé ce mode que nous avons retenu la méthode de cet auteur.

§ 2. — NOS MODIFICATIONS AU MODE OPÉRATOIRE DE WONG ; LEURS RAISONS

A. — Lorsqu'on dose colorimétriquement l'hémoglobine par le sulfocyanure ferrique, il faut évidemment éviter tout apport étranger de fer; aussi, comme WONG le recommande, nous nous sommes assuré que tous nos réactifs étaient parfaitement exempts de fer quand nous avons entrepris l'application de sa méthode.

Pour cela, nous avons simplement recouru à la réaction

colorée servant de base à cette méthode (54) ; nous n'avons ainsi décelé de fer que dans l'acide sulfurique concentré courant que nous avons d'abord utilisé, d'où notre emploi constant, par la suite, d'acide sulfurique pur Poulenc, type Congrès ($d = 1,83$), qui s'est toujours montré exempt de fer.

Mais, cette question des réactifs réglée, un apport de fer étranger, parfois important, peut encore se produire de façon tout à fait fortuite et entraîner de sérieuses erreurs par excès : c'est celui dû à la filtration du précipité tungstique à travers des papiers-filtres imprégnés de ce métal.

Au cours des dosages dont nous avons résumé les résultats ci-dessus (tableau II), WONG n'ayant donné aucune indication spéciale relative au papier-filtre qu'il employait, nous ne nous étions nullement inquiété de tels apports. Or, nous utilisions dans ces dosages des papiers-filtres F_2 (filtres définis dans le tableau III) qui abandonnaient une notable proportion de fer. Nous nous en sommes heureusement bientôt rendu compte en pratiquant, avec des réactifs chez lesquels nous venions de constater l'absence complète de fer, des dosages à blanc en suivant tous les détails de la technique de WONG. Nous obtînmes en effet ainsi — ce qui démontrait bien l'apport inopiné de fer dû à la filtration — une nette coloration rouge de sulfocyanure ferrique en nous servant des papiers-filtres F_2 , et plus généralement, de tous les papiers-filtres courants, tandis que nous ne pouvions mettre aucune trace de fer en évidence si nous supprimions la filtration.

(54) Cette réaction étant très sensible, et sa sensibilité pouvant encore être augmentée par concentration du sulfocyanure ferrique — lorsqu'il s'en forme — dans quelques gouttes d'oxyde d'éthyle.

Nous avons eu la curiosité de déterminer approximativement quelle pourrait être, dans l'étude d'un sang, la quantité de fer attribuée en trop à ce sang à la suite d'une filtration à travers les divers papiers-filtres courants. Nous l'avons fait en nous conformant aux conditions habituelles de la technique de Wong, c'est-à-dire en filtrant, dans des dosages à blanc, 25 cm³ environ de liquide à travers chacun des papiers examinés dont nous utilisons un disque de 10 cm. de diamètre; sur 20 cm³ de filtrat, nous faisons alors la détermination colorimétrique habituelle. Nous avons aussi calculé, d'autre part, la quantité absolue de fer ainsi abandonnée par ces filtres.

Nos résultats sont rapportés dans le tableau III.

TABLEAU III

Filtre utilisé (filtres ronds de 10 cm. de diamètre)	Fer attribué en trop à 100 cm ³ de sang (en mg)	Fer abandon- né par le filtre (en mg)	Poids total des cendres du filtre (en mg)
Filtre F ₁ , en papier-filtre rame ordinaire	21,6	0,043	1,2
Filtre F ₂ , « sans cendres » (lavé à CIH et FH, marque Durieux)	4,3	0,0086	0,154
Filtre F ₃ , « sans cendres » (lavé à CIH, FH et dé- graissé, marque Du- rieux)	3,7	0,0074	0,090

D'après ces résultats, on voit que du fait de la filtration toutes les valeurs réunies dans le tableau II sont systématiquement entâchées d'une erreur par excès, erreur dont la valeur absolue est toujours d'environ 4,3 (55).

(55) Etant donné les filtres auxquels nous avons recours (filtres F₂).

Le simple examen de ce tableau II faisait d'ailleurs prévoir une erreur de cette sorte et de cette importance. En effet, alors que l'erreur relative ne dépassait pas 4 pour cent dans la détermination des hémoglobinémies, elle atteignait +7 à +10 pour cent dans le cas des dosages d'épreuve pratiqués sur les solutions d'alun à 50 mg de fer par 100 cm³ et jusqu'à +16 % pour celles dont 100 cm³ correspondaient seulement à 30 mg de ce métal; c'est bien que dans tous ces dosages devaient s'ajouter une erreur fortuite valant toujours de 3 à 4 pour cent, et une erreur systématique par excès pratiquement constante en valeur absolue (56), erreur qui passait inaperçue dans le cas des sangs où l'on n'a aucun élément de comparaison, mais devenait au contraire très nette dans celui des solutions d'alun. C'est d'ailleurs pour établir la preuve de l'erreur systématique que nous avons entrepris les dosages à blanc qui nous permirent d'en déterminer l'origine et l'ordre de grandeur.

Les apports de fer dûs aux filtrations s'expliquent aisément si l'on se souvient que les matières minérales des papiers-filtres sont celles que l'on rencontre dans leurs eaux de fabrication et que n'enlèvent jamais complètement les lavages à l'acide chlorhydrique, à l'acide fluorhydrique et à l'eau distillée qu'ils subissent.

L'importance des erreurs que ces apports provoquaient dans la méthode de WONG (ces erreurs atteignant environ 8,6 pour cent dans le cas des hémoglobinémies humaines normales et des filtres F₂, comme il est facile de l'établir

(56) Puisque, dans le cas des solutions d'alun, l'erreur relative était d'autant plus forte que le fer dosé était moindre,

d'après ce qui précède) nous mettait dans l'obligation de les éviter.

Nous avons d'abord essayé d'y parvenir en recourant à des papiers-filtres F₄, sans cendres, de traitement plus poussé (double lavage à ClH et FH; quantité totale de cendres par filtre rond de 10 cm. de diamètre: 0 mg, 086) mais ces filtres renfermaient encore une notable proportion de fer.

Aussi, finalement, au lieu de persister dans cette voie, nous avons remplacé la filtration par une centrifugation, ce qui résoud le problème. Il suffit en effet de centrifuger une assez grande partie (40 cm³) du précipité tungstique pendant deux minutes à 2.000 tours pour pouvoir pipeter directement et sans difficultés, dans le tube à centrifugation, les 20 cm³ de liquide clair nécessaires au dosage colorimétrique.

B. — Toute erreur de dosage due à la filtration ainsi écartée, nous avons apporté à la technique de Wong plusieurs autres améliorations sur divers points où elle pouvait gagner en précision et commodité.

1° Nous avons d'abord remplacé, pour préparer l'étalon colorimétrique, le simple tube à essai gradué préalablement à 20 et 25 cm³ et à bouchon en caoutchouc par un ballon jaugé de 25 cm³ bouchant à l'émeri. Nous évitons ainsi tout apport de fer étranger, quand on agite pour le mélange, par un bouchon en caoutchouc douteux (ce qui est souvent le cas, tout comme pour les bouchons en liège), et rendons du même coup toutes les mesures très exactes dans la préparation de la solution étalon. Pour obtenir désormais celle-ci, nous introduisons, en effet, successivement dans le ballon: 1 cm³ de la solution d'alun de fer étalon, 0 cm³, 8

de l'acide sulfurique Congrès, puis environ 18 cm³ d'eau distillée pour diluer; nous additionnons ensuite de 1 cm³ de la solution saturée de persulfate de potassium et de 4 cm³ de la solution de sulfocyanure; enfin, nous refroidissons à la température ambiante sous le robinet et complétons exactement au trait de jauge avec de l'eau distillée; après mélange soigneux, la solution est alors prête à utiliser.

Quant aux 20 cm³ de liquide clair tungstique, au centimètre cube de persulfate et aux 4 cm³ de sulfocyanure qui constituent la solution colorée à doser, nous les mélangeons simplement dans un Bécher, avec un agitateur en verre, après les y avoir directement versés.

2° D'autre part, pour étendre l'inconnu à 50 cm³ avec exactitude, nous diluons d'abord jusqu'à ce que le liquide parvienne à la base du col du ballon jaugé (soit jusqu'à environ 48 cm³), puis détruisons la mousse toujours présente par addition d'une dizaine de gouttes d'alcool à 95° exempt de fer (57); nous pouvons alors compléter très exactement avec de l'eau distillée au trait de jauge de 50 cm³.

3° Enfin, nous avons substitué à la solution aqueuse à 40 cm³ d'acétone et 291 g. 3 de sulfocyanure de potassium par litre (c'est-à-dire, 3 N en NCSK) une solution à 500 g. du sel et toujours 40 cm³ d'acétone par litre.

La concentration en sulfocyanure de potassium des solutions colorées à comparer devient ainsi beaucoup plus forte, atteignant sensiblement 80 g. par litre, ce qui réalise de meilleures conditions de dosage.

(57) Ce qui ne gêne en rien, nous l'avons vérifié, la suite du dosage.

En effet, les travaux, déjà cités (page 54), de de BROUCKÈRE et GILLET [14] et de SZEGOE et CASSONI [124, 125] ont montré qu'une concentration de cet ordre permettait la transformation de tout le sulfocyanure ferrique formé en son dérivé plus coloré $(\text{NCS})^3 \text{Fe}$, 9NCS , et que la coloration de celui-ci était, dans ces conditions, indépendante dans de larges limites de la nature et de la concentration de l'acide libre. Les mêmes travaux ont de plus établi que dans le dosage du fer basé sur le complexe précédent les solutions à comparer résistaient mieux à l'hydrolyse que le temps finit toujours par produire, et partant (58) à la décoloration, lorsqu'elles renfermaient cette proportion d'environ 80 g. par litre de NCSK ; c'est ainsi que l'adoption de cette dernière modification nous a permis d'obtenir des solutions à comparer gardant toute leur couleur pendant au moins deux heures.

C. — Grâce aux diverses améliorations précédentes, nous avons abaissé l'erreur relative à moins de 2 % dans les dosages pratiqués sur des solutions d'alun de fer et d'ammonium de titre connu, alors que ces mêmes erreurs approchaient encore de 4 % après le simple remplacement de la filtration par la centrifugation.

Mais, passant ensuite à des dosages d'hémoglobine dans le sang, et quoi qu'en opérant exactement de la même manière, nous ne pûmes constamment obtenir une pareille précision; en effet, les pourcentages de fer que nous trouvions ainsi avec plusieurs prises d'essai de mêmes sangs dif-

(58) La décoloration que présentent à la longue les solutions de sulfocyanure ferrique ou du complexe $(\text{NCS})^3$, 9 NCS étant en effet concomitantes à l'hydrolyse de ces composés,

féraient parfois de près de 4 %, comme on peut le voir dans le tableau IV où nous les avons réunis.

TABLEAU IV

Sang étudié	X _{Fe}	Différences maxima (rapportées à 100 mg de fer)
Sang de bœuf	{ 51,8	—
	{ 50,1	3,3
	{ 50,6	2,3
Sang de porc	{ 56,6	—
	{ 55,2	2,5
	{ 54,6	3,5
Sang humain d'anémique	{ 36,1	—
	{ 37,4	3,6
	{ 36,8	2,0
Sang humain normal	{ 57,8	—
	{ 59,9	3,6

Nous avons alors cherché, afin d'y remédier, quelle pouvait être la cause des différences anormales constatées; voici ce que nous avons alors observé:

Comme dans la technique de WONG, nous nous étions jusque là contenté, pour libérer le fer de l'hémoglobine, d'additionner 0 cm³, 5 du sang étudié de 2 cm³ d'acide sulfurique concentré et de secouer le ballon en tournant pendant une à deux minutes. Or, l'action de l'acide sulfurique sur le sang en entraîne immédiatement la coagulation; aussi, la simple agitation pendant une à deux minutes à la température de 40 à 45 degrés atteinte par suite du mélange ne suffit généralement pas pour provoquer la désagrégation complète du magma formé et donner un liquide homogène; il en résulte que lorsque, aussitôt après, on dilue, plusieurs fragments du magma peuvent persister et retenir une certaine proportion de fer.

C'est à cette mauvaise liquéfaction qu'il fallait attribuer

les différences anormales ci-dessus constatées; en effet, dès que nous avons évité cette cause d'erreur, nous sommes parvenus avec le sang à la précision même que nous avions atteint avec les solutions d'alun de fer et d'ammonium.

Pour cela, nous avons apporté au mode opératoire de WONG la nouvelle modification suivante: « Mettre la prise de 0 cm³ 5 du sang étudié (sang défibriné) puis les 2 cm³ d'acide sulfurique concentré dans un large tube en Pyrex; chauffer légèrement sur une petite flamme de façon à ne pas dépasser 80-85 degrés, température très inférieure à la température d'ébullition de l'acide; en même temps, bien mélanger avec un agitateur. On obtient ainsi rapidement (en trois minutes au maximum) un liquide toujours homogène qu'on additionne de 2 cm³ de la solution de persulfate de potassium saturée; après avoir agité et refroidi, transvaser quantitativement le tout dans un ballon jaugé de 50 cm³ bouchant à l'émeri, en s'aidant de lavages de l'agitateur et du tube à l'eau distillée, lavages qu'on poursuit jusqu'à dilution à environ 25 cm³ du contenu du ballon; puis, terminer le dosage de la façon habituelle compte tenu des modifications déjà indiquées ».

La température atteinte par suite du chauffage ci-dessus restant relativement basse, nous n'avons à craindre pas plus la moindre évaporation de l'acide sulfurique que la moindre coloration jaune ou brune pour le liquide clair ultérieurement séparé du précipité tungstique, évaporation et surtout coloration qui pourraient fausser le dosage colorimétrique (59);

(59) L'évaporation serait d'ailleurs sans grande influence grâce à notre augmentation de la concentration en sulfocyanure de potassium (voir page 69).

Dans ces conditions, la précision minimum de 2 % s'étend aux sangs, comme le montre bien le tableau V où sont résumés les résultats obtenus pour plusieurs prises d'essai de mêmes sangs (non hémolysés) après adoption de la nouvelle modification.

TABLEAU V

Sang étudié	X _{Fe} obtenus avec chauffage	Différences maxima (rapportées à 100 mg. de fer) entre les va- leurs obtenues avec chauffage	X _{Fe} obtenus sans chauffage
Sang de mouton	{ 41,2	—	41,4
	{ 42,0	1,9	39,8
	{ 41,7	1,2	40,1
Sang de bœuf	{ 48,3	—	46,4
	{ 47,4	1,9	47,9
	{ 47,9	0,8	—
Sang humain normal	{ 59,6	—	60,0
	{ 59,9	0,5	57,8
	{ 60,4	1,3	59,1
	{ 60,6	1,7	58,2

A côté des résultats précédents, nous avons aussi noté dans le tableau V ceux trouvés dans chaque cas sans appliquer le chauffage; on peut ainsi aisément constater que lorsqu'on chauffe les chiffres obtenus sont bien, par suite de la meilleure libération du fer, plus élevés.

En définitive, moyennant toutes les modifications que nous avons décrites, la méthode de WONG permet de déterminer les hémoglobinémies avec une précision effective d'au moins 2 % tout en conservant sa rapidité et sa simplicité de moyens primitives.

D. — En exposant notre amélioration du chauffage, nous avons indiqué qu'il ne fallait pas dépasser 80-85 degrés et qu'ainsi aucun jaunissement ou brunissement ne venait ren-

dre la comparaison colorimétrique erronée. Il faut toutefois se rapprocher suffisamment de cette température si l'on veut obtenir assez rapidement l'homogénéisation.

Dès lors, il suffit d'un instant d'inattention pour que, dans un dosage, l'on chauffe trop; de ce fait, l'acide sulfurique oxyde les protéides présents, ce qui se traduit par une libération de composés organiques fortement condensés en carbone, d'où par un noircissement du mélange de sang et d'acide chauffé. La plupart des composés empyreumatiques obtenus échappant (en raison de la dimension restreinte de leur molécule) à l'action précipitante du tungstate de sodium, le liquide clair ultérieurement séparé du précipité tungstique est alors plus ou moins jaune ou brun au lieu d'être incolore comme normalement, et par suite, on doit recommencer le dosage si l'on veut éviter l'erreur que cette coloration peut entraîner.

Se trouver ainsi contraint à refaire divers dosages est un inconvénient auquel nous devons parer, tout en respectant les qualités que présentait déjà la méthode de WONG après les précédentes améliorations de son mode opératoire.

Nous y sommes parvenu en remplaçant la solution précipitante de tungstate de sodium par une solution de phosphotungstate de sodium, défécant qui, par son cation phosphotungstique, est doué, comme l'a montré CRISTOL [21], du pouvoir désalbuminant le plus grand.

L'action précipitante du phosphotungstate de sodium croissant avec la concentration, nous avons intérêt, dans ce remplacement, à prendre une solution de phosphotungstate de titre assez fort et à faire agir les 2 cm³ de ce nouveau défécant sur le moins de liquide possible. Nous ne pouvions toutefois employer dans chaque dosage une quantité absolue trop élevée de phosphotungstate de sodium; en effet, ce composé était susceptible, si sa concentration

dépassait une certaine valeur au moment de la comparaison colorimétrique, de provoquer une erreur en raison de sa faible couleur jaune; de plus, un taux important de phosphates risquait, nous l'avons vu page (54), d'entraver la formation du complexe coloré qui sert de base à la méthode de WONG.

Nous avons dès lors fait agir le phosphotungstate de sodium selon le procédé suivant: « Transvaser quantitativement le mélange homogénéisé par chauffage dans un ballon jaugé de 50 cm³ sans dépasser une dilution de 14 à 15 cm³ (et non plus d'environ 25 cm³ comme précédemment (60); puis, l'additionner de 2 cm³ d'une solution aqueuse à 15 % de phosphotungstate de sodium exempt de fer; enfin, agiter et poursuivre le dosage de la façon habituelle». De cette manière, même quand nous avons un trop chauffé les magmas de sang et d'acide, nous avons bien obtenu, après centrifugation, des liquides clairs toujours parfaitement incolores (61).

Nous devons ajouter que concurremment au remplacement du réactif tungstique par un réactif phosphotungstique nous avons dû apporter deux modifications supplémentaires au mode opératoire de WONG.

La première a consisté à substituer aux solutions de persulfate et de sulfocyanure de potassium des solutions cor-

(60) Dilution indiquée par WONG [144] et qui était la dilution minimum nécessaire pour éviter, lors de la désalbumination tungstique, la formation brusque de gros caillots rendant cette opération irrégulière, fait qui ne se produit jamais avec le défécant phosphotungstique.

(61) La faible coloration de la minime quantité de phosphotungstate de sodium utilisée passant pratiquement tout à fait inaperçue,

respondantes de persulfate et de sulfocyanure de sodium ou d'ammonium exempts de fer. Sans cette substitution, nos comparaisons colorimétriques auraient en effet été gênées par des précipitations de phosphotungstate de potassium, sel bien moins soluble que le tungstate.

Quant à la seconde, elle a été de porter, par surcroît de précaution, la quantité d'acide sulfurique servant à minéraliser les prises d'essai de sang à 2 cm³, 5 (62), afin d'obtenir une acidité assez forte pour annihiler, le cas échéant, toute action empêchante du cation phosphorique (63).

Grâce aux dernières modifications ci-dessus (groupe D), nous avons enfin abouti à un nouveau mode opératoire assurant constamment à la méthode de WONG les caractères de précision, de rapidité et de simplicité de moyens qui nous l'avaient fait envisager, et dès lors, nous avons définitivement adopté la méthode un peu différente ainsi réalisée.

§ III. - - ENSEMBLE DU NOUVEAU MODE OPÉRATOIRE; SA VALEUR

Réactifs et solution titrée utilisés:

En dehors de la solution étalon, tous sont naturellement exempts de fer, ce que nous avons vérifié, comme il a déjà été dit pages 64-65.

Ce sont:

1° L'acide sulfurique pur Poulenc, type Congrès 1922, à 65°5 Beaumé ($d = 1,83$).

(62) La quantité d'acide employée dans le cas de l'étalon passant, en conséquence, de 0 cm³ 8 à 1 cm³.

(63) D'après ce que de BROUCKÈRE et GILLET [14] ont indiqué,

2° Une solution aqueuse de persulfate d'ammonium (64) pur pour analyse (Rhône-Poulenc) à 2 g, 5 pour cent centimètres cubes, solution dont l'action équivaut sensiblement à celle de la solution saturée de persulfate de potassium.

3° Une solution aqueuse de phosphotungstate de sodium pur (Rhône-Poulenc) à 15 g. pour 100 cm³.

4° Une solution aqueuse à 500 g. de sulfocyanure d'ammonium (65) pur Poulenc et à 40 cm³ d'acétone pure pour 1.000 cm³, solution qui correspond pratiquement à la solution de sulfocyanure de potassium et d'acétone de WONG.

5° Enfin, une solution aqueuse titrée, à 0 g, 863 d'alun de fer et d'ammonium cristallisé pur Poulenc et à 2 cm³ d'acide sulfurique Congrès pour 1.000 cm³ (solution étalon):

Pratique:

Mettre dans un large tube en Pyrex exactement 0 cm³, 5 du sang étudié (sang défibriné), puis 2 cm³, 5 d'acide sulfurique; bien mélanger avec une agitateur, tout en chauffant légèrement, de façon à transformer complètement le magma produit en un liquide homogène; additionner ensuite de 2 cm³ de la solution de persulfate d'ammonium, agiter, refroidir sous un robinet, et transvaser quantitativement dans un ballon jaugé de 50 cm³ bouchant à l'émeri en poursuivant les lavages par 3 à 4 cm³ jusqu'à dilution du contenu du ballon à environ 15 cm³. Introduire alors dans le ballon 2 cm³ du réactif phosphotungstique, agiter, et refroidir à la température ambiante. Ceci fait, complé-

(64) Nous avons utilisé le sel d'ammonium de préférence à celui de sodium car nous ne disposions pour ce dernier que d'échantillons moins purs.

(65) Idem note (64).

ter exactement à 50 cm³ avec de l'eau distillée après avoir, s'il y a lieu, détruit la mousse grâce à quelques gouttes d'alcool à 95° lorsqu'on s'est trouvé vers 48 cm³. Boucher, bien mélanger, puis verser 35 à 40 cm³ du mélange dans un grand tube à centrifugation (tube à centrifugation en Pyrex de 45 cm³, par exemple) et centrifuger deux minutes à 2.000 tours. Enfin, pipeter exactement dans un Bécher 20 cm³ du liquide surnageant, puis 1 cm³ de la solution de persulfate, et 4 cm³ de la solution de sulfocyanure, en mélangeant avec un agitateur; on a alors la solution colorée du dosage.

D'autre part, dans un ballon jaugé de 25 cm³ bouchant à l'émeri, introduire 1 cm³, exactement mesuré, de la solution étalon, puis 1 cm³ d'acide sulfurique; diluer à environ 17 cm³ avec de l'eau distillée; additionner de 1 cm³, 8 (66) de la solution de persulfate et de 4 cm³ de la solution de sulfocyanure, compléter exactement à 25 cm³ avec de l'eau distillée, boucher et mélanger; enfin, comparer à la solution colorée du dosage.

On obtient ainsi, à l'aide de l'une ou l'autre des équation (I) et (III) vues précédemment (pages 61 et 63), le résultat cherché (ce résultat étant exprimé en taux de fer X_{Fe} par I et en taux d'hémoglobine X_{Hb} par III)).

Valeur de notre mode opératoire:

En raison du grand nombre de modifications que notre mode opératoire apportait à celui de WONG, il nous a paru nécessaire de vérifier sa valeur rigoureusement.

(66) Au lieu de 1 cm³ comme dans le mode opératoire de WONG, afin que les quantités de persulfate finalement reçues par un même volume de l'inconnu et de l'étalon soient identiques.

Nous l'avons fait de la façon classique, c'est-à-dire :

a) En l'utilisant d'abord pour doser des quantités connues de fer et en comparant les résultats obtenus aux chiffres théoriques;

b) En l'appliquant de plus au dosage de plusieurs prises d'essai de mêmes sangs et en comparant entre elles les diverses valeurs trouvées pour l'hémoglobinémie de chacun d'eux;

c) Enfin, en comparant les chiffres donnés par son application à divers sangs à ceux correspondant à des prises d'essai de ces sangs additionnées de quantités de fer connues et d'importance variable.

Comme on peut le voir dans le tableau VI où sont résumés les résultats de ces trois séries de dosages, toutes ces expériences montrent que la précision de notre mode opératoire est bien d'au moins 2 %, comme nous l'avons indiqué.

(Voir tableau ci-contre) :

Pour parvenir à une telle précision, il faut évidemment satisfaire à toutes les conditions de la meilleure exactitude.

Ainsi :

a) Il faut homogénéiser le sang étudié par agitation avant toute prise d'essai et réaliser ces prises en mesurant les 0 cm³, 5 de sang par écoulement direct lent entre deux traits de pipettes spécialement graduées pour un tel usage (67) ;

(67) Le dosage envisagé ne permettant pas de diluer ces prises de sang, on ne peut, en effet, les faire avec précision de la façon habituelle, c'est-à-dire, en se servant d'une pipette à écoulement direct et en récupérant le sang qu'elle retient indûment grâce à quelques lavages.

TABLEAU VI

Matériel étudié	Fer dosé (en mg. pour 100 cm ³)	Différences (rapportées à 100 mg de fer)	
a	Solution d'alun de fer et d'am- monium à 50 mg. de fer par 100 cm ³	{ 50,1	+0,2
		{ 49,7	—0,6
		{ 49,5	—1,0
	Solution d'alun de fer et d'am- monium à 30 mg de fer par 100 cm ³	{ 30,3	+1,0
		{ 29,8	—0,7
		{ 30,0	0,0
b	Sang de porc	{ 52,5	—
		{ 53,4	1,8
		{ 53,1	1,2
	Sang de mouton	{ 44,0	—
		{ 43,3	1,6
		{ 43,2	1,8
	Sang humain normal	{ 55,6	—
		{ 56,3	1,3
		{ 56,1	0,9
	Sang de porc seul (moyenne de plusieurs dosages)	{ 53	—
		{ 63,6	+1,0
		{ 72,4	—0,8
c	Sang de bœuf seul (moyenne de plusieurs do- sages)	{ 50	—
		{ 79,5	—0,6
		{ 51	—
	Sang de cheval seul (moyenne de plusieurs do- sages)	{ 90,4	—0,7
		{ 102,0	+1,0
		{ 51	—

(1) Par addition de 0 cm³, 1 d'une solution d'alun de fer ammoniacal **S** à 50 mg. de fer par 100 cm³.

(2) Par addition de 0 cm³, 2 de la solution **S**.

(3) Par addition de 0 cm³, 3 de la solution **S**.

(4) Par addition de 0 cm³, 4 de la solution **S**.

(5) Par addition de 0 cm³, 5 de la solution **S**.

b) Il faut d'autre part effectuer les comparaisons colorimétriques de façon aussi parfaite que possible, et dans ce but:

— utiliser de préférence le microcolorimètre de Dubosq-PELLIN et l'appareillage électrique qui lui est adapté (appareillage principalement constitué d'une lampe Philips de 100 w. à filament ramassé et d'une résistance variable qui sert à régler l'intensité du courant traversant la lampe), leur ensemble permettant le mieux d'obtenir la lumière incidente la plus appropriée;

— prendre toutes les précautions d'usages rappelées page 24;

— enfin, vérifier soigneusement avant chaque comparaison que les deux côtés du colorimètre, cuves y compris, transmettent la lumière identiquement, afin d'éviter les erreurs systématiques que toute inégalité de transmission entraînerait.

Bien entendu, ce sont là autant de précautions que nous prenons toujours dans nos dosages.

*
**

Note sur le recueil des sangs:

Nous avons vu (page 16) que d'une façon générale les méthodes de dosage de l'hémoglobine s'appliquent soit au sang défibriné, soit au sang total avant toute coagulation. Par suite, lorsqu'on veut déterminer des hémoglobinémies en clinique, on ne peut recourir aux prises de sang envoyées aux laboratoires par les patriciens, celles-ci étant déjà coagulées ou faites sur un anticoagulant.

Cela nous a amené à rechercher si notre mode opératoire ne pouvait, de façon plus pratique, s'accommoder de ces sangs recueillis sur un anticoagulant, c'est-à-dire, le plus souvent, additionnés de fluorure de sodium, d'oxalate de

potassium (ou de sodium), ou de citrate de sodium dans la proportion de 2 pour mille (68).

Pour cela, nous avons déterminé l'hémoglobine de quatre malades, à la fois sur leur sang défibriné, fluoruré, oxalaté et citaté, en ayant eu soin de préparer ces divers échantillons à partir de la même ponction veineuse. Nous avons rapporté les résultats ainsi obtenus dans le tableau VII:

TABLEAU VII

Malade	X _{Hb} obtenus avec le sang			
	défibriné	fluoruré	oxalaté	citraté
André P. . .	11,2	10,1	11,2	11,0
Marcelle G.	10,3	9,2	10,4	10,2
Jean V. . .	13,6	12,8	13,45	13,7
Joseph D. .	12,3	10,9	12,1	12,2

on voit qu'ils permettent de conclure que notre mode opératoire s'accommode aussi bien des sangs oxalatés ou citratés que des sangs défibrinés, mais qu'il ne peut porter sur les sangs fluorurés (69). Dès lors, dans nos dosages ultérieurs d'hémoglobine, nous avons indifféremment utilisé des sangs défibrinés ou recueillis sur 2 pour mille d'oxalate de potassium ou de citrate de sodium.

(68) Additions qui par leur masse relative ne modifient pratiquement pas la composition des sangs ainsi traités.

(69) Probablement en raison de l'action empêchante que les fluorures exercent (de BROUCKÈRE et GILLET [14]) sur la formation du sulfocyanure ferrique et du complexe (NCS)³ Fe, 9 NCS.

CHAPITRE IV

QUELQUES RESULTATS DE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE SELON NOTRE MODE OPERATOIRE

§ 1. — L'HEMOGLOBINÉMIE CHEZ L'HOMME ET DIVERS ANIMAUX A L'ÉTAT NORMAL

On sait (70) que l'hémoglobinémie des adultes normaux d'une espèce animale donnée est toujours comprise entre deux limites assez rapprochées propres à l'espèce considérée; par suite, ces deux limites, ou un chiffre moyen, définissent « l'hémoglobinémie normale » relative aux adultes de cette espèce. Les écarts entre les valeurs trouvées au cours des diverses déterminations répondent, d'une part, aux différences individuelles de l'hémoglobinémie et, d'autre part, aux variations physiologiques que l'altitude, l'exercice musculaire, le climat, etc... lui impriment chez un même sujet.

On sait aussi qu'avant l'âge adulte la plupart des hém-

(70) Voir par exemple à ce sujet le traité technique d'hématologie de JOLLY [60].

globinémies normales n'atteignent pas la valeur fixe qu'elles présentent par la suite; toutefois, au moment de la naissance, elles sont souvent, par exception, transitoirement supérieures à cette valeur.

De toute façon, si l'on considère séparément les sujets de chaque sexe, on constate que les hémoglobinémies normales se rapportant au sexe féminin sont généralement un peu plus faibles que les hémoglobinémies normales homologues du sexe masculin.

Bien des auteurs se sont intéressé aux hémoglobinémies normales et les ont déterminé. La commodité et la précision de la méthode de dosage de l'hémoglobine que nous avons établi nous ont incité à en étudier, à notre tour, un certain nombre.

Avant de rapporter nos résultats, il nous a paru bon, afin de synthétiser et dans un but de comparaison, de rappeler quelques-unes des valeurs indiquées jusqu'à ce jour pour les hémoglobinémies normales. Nous l'avons fait dans le tableau VIII en les classant, pour plus de commodité, par espèce animale et par ordre chronologique. Nous avons inscrit en même temps dans ce tableau, en regard de ces diverses valeurs, l'auteur de leur détermination et leur référence bibliographique; le lecteur pourra ainsi se faire une opinion sur le degré d'exactitude dont chacune d'elles peut être créditée.

TABLEAU VIII

Espèce animale	X Hb (g d'hémoglobi- ne pour 100 cm ³ de sang)	Année de la détermination	Auteur de la détermination
MAMMIFERES			
Humaine en géné-	12, 9	1877	Malassez [81]
ne	12,09 à 15,07	1844	Becquerel et Rodier [7]
n.	13,58	1871	(1)
n.	14,57	1885	Otto [97]
n.	14,39 à 18,03	1928	Horneffer-Lutz [52]
n.	16,03	1931	Schmoll [117]
ne	11,57 à 13,69	1844	Becquerel et Rodier [7]
n.	12,63	1871	(1)
n.	13,26	1885	Otto [97]
n.	13,7	1931	Schmoll [117]
eau-ne	14,8	1901	Moreau [84]
n.	20	1928	Elvehjem et Peterson [29]
	10 à 14	? (vers 1904)	(2)
	11,62	? (vers 1895)	Nasse (3)
	11,67	? (vers 1895)	Simon (3)
	9,9 à 14,2	1928	Huber [54]
nants en général	7,5 à 11,5	1928	Huber [54]
	13,65	1871	(1)
	12,39	1882	Lambling [70]
	11,43 à 13,02	? (vers 1895)	Pelouze (3)
	8,5 à 10,42	? (vers 1904)	(2)
	11,20	1871	(1)
	14,36	1871	(1)
	12,05 à 14,17	? (vers 1895)	Pelouze (3)
	14,36	? (vers 1904)	(2)
en général	11,8 à 17,0	1882	Branly [13]
	12,0 à 14,5	? (vers 1895)	Hoppe-Seyler (3)
	14 à 14,5	? (vers 1904)	(2)
	10,8 à 17,8	1928	Huber [54]
mâle	12,27 à 15,98	1885	Otto [97]
femelle	12,06 à 14,98	1885	Otto [97]
en général	9,0	1877	Malassez [81]
	7,0 à 9,5	? (vers 1895)	Subbotin (3)
	12	? (vers 1904)	(2)
mâle	9,43 à 10,76	1885	Otto [97]
femelle	7,89 à 9,41	1885	Otto [97]
	9,2	1877	Malassez [81]
	14	? (vers 1904)	(2)
	19 à 20	1931	De Kock [65]
II. — OISEAUX			
	8,26 à 8,76	? (vers 1895)	Pelouze (3)
	8,90	? (vers 1895)	Hoppe-Seyler (3)
	9,1	1871	(1)
	8,1 à 8,2	? (vers 1895)	Pelouze (3)
	12,3	1877	Malassez [81]
	15,4	1877	Malassez [81]
	7,31 à 12,56	? (vers 1895)	Subbotin (3)
	11	? (vers 1904)	(2)

III. — REPTILES

<i>Lacerta agilis.</i>	9,6	1877	Malassez [81]
<i>Lacerta viridis.</i>	7,2	idem	idem
<i>Tropidonotus natrix.</i>	9,4	idem	idem

IV. — POISSONS

<i>Anguilla muraena.</i>	9,1	1877	Malassez [81]
<i>Abramis brama.</i>	4,3	idem	idem
<i>Lanciscus dobula.</i>	3,1	idem	idem
<i>Lanciscus rutilus.</i>	3,6	idem	idem
<i>Torpedo marmorata.</i>	1,4	idem	idem

V. — BATRACIENS

<i>Rana fusca.</i>	8	1877	Malassez [81]
<i>Rana viridis.</i>	5,3	1877	Malassez [81]
idem.	8 à 10	? (vers 1904)	(2)
<i>Proteus.</i>	4,8	1877	Malassez [81]
idem.	6 à 8	? (vers 1904)	(2)

(1) Valeur indiquée par Preyer [105] comme correspondant à la moyenne générale des déterminations antérieures à 1871.

(2) Donnée rapportée par Bezançon et Labbé dans leur traité d'hématologie [9].

(3) Donnée rapportée par Lambling [71] dans l'Encyclopédie chimique de Frémy.

ETUDE PERSONNELLE:

Les hémoglobinémies normales que nous avons étudiées ont trait:

a) A l'espèce humaine;

b) A des animaux de boucherie (cheval, bœuf, mouton et porc), à des animaux de basse-cour (lapin, oie, canard, coq et pigeon) et à des animaux de laboratoire (chien, cobaye et souris).

Pour chaque espèce, notre étude a simplement consisté à doser l'hémoglobine dans le sang de plusieurs sujets normaux.

Dans le cas des animaux de boucherie, nos dosages ont toujours porté sur des sangs provenant de bêtes reconnues saines par les services vétérinaires, sangs qui étaient recueil-

lis au moment de l'abattage et aussitôt défibrinés par battage. Dans les autres cas, nous nous sommes servi de sangs prélevés soit par ponction veineuse (homme et chien), soit par sacrifice (animaux de basse-cour), soit par ponction du cœur (cobaye et souris), et additionnés d'oxalate de potassium.

Nous avons naturellement exprimé tous nos résultats en taux d'hémoglobine X_{Hb} , exception faite pour ceux relatifs aux espèces animales dont nous connaissions trop imparfaitement le coefficient f .

a) *Résultats obtenus pour l'espèce humaine :*

Nous avons ici sérié nos dosages d'hémoglobine en envisageant séparément non seulement les adultes, les enfants de 7 à 13-14 ans, et les vieillards de plus de 70 ans, mais encore, le sexe féminin et le sexe masculin. De plus, après avoir fait porter nos premiers dosages sur des blancs européens, nous avons encore considéré ultérieurement les hommes adultes de race arabe, ceux de race jaune (annamites), et ceux de race noire (sénégalais).

Nous avons résumé dans le tableau IX l'ensemble des résultats obtenus.

(Voir tableau page 88)

Ces résultats s'accordent, on le voit, avec ce que nous avons rappelé des hémoglobinémies normales et ils cadrent avec les valeurs généralement indiquées pour ces données.

Par ailleurs, ils permettent d'avancer qu'il n'y a pas de différences sensibles entre l'hémoglobinémie normale de l'adulte et du vieillard de même sexe, et que chez l'Homme l'hémoglobinémie normale ne dépend pas — tout au moins pour les adultes de sexe masculin — de la race. Remarquons toutefois à ce sujet que pour les sénégalais nous

TABLEAU IX

Origine du sang	X _{Hb} (g d'hémoglobine pour 100 cm ³ de sang)
I. — Blancs européens	{ 15,9 15,3 14,8
Adultes ♂	{ 14,5 14,4 14,2 13,6
	{ 13,7 13,3 12,6
Adultes ♀	{ 12,5 12,4 12,2 11,7
Enfants (de 7 à 13-14 ans) ♂	{ 13,9 13,4 13,2 13,1 12,6 11,8
Enfants (de 7 à 13-14 ans) ♀	{ 12,5 12,3 11,4 11,3 11,0
Vieillards (de plus de 70 ans) ♂	{ 15,0 14,4 13,3 13,1
Vieillards (de plus de 70 ans) ♀	{ 13,3 11,9 11,5
II. — Arabes	{ 15,4 14,6 14,3
Adultes ♂	{ 13,8 13,6
III. — Race jaune	{ 15,0 14,7 14,2
Adultes ♂	{ 14,0 13,5
IV. — Race noire	{ 16,0 15,7 14,9
Adultes ♂	{ 14,6 13,7

avons surtout trouvé des hémoglobinémies élevées; mais, ceci nous paraît uniquement imputable à ce que ces hommes avaient une musculature puissante et s'occupaient de travaux de force.

b) Résultats obtenus chez les animaux:

Pour les animaux, nous ne nous sommes préoccupé que des adultes, et sans faire de distinction de sexe.

Nos résultats sont réunis dans le tableau X.

TABLEAU X

Origine du sang	Hémoglo- binémie	
Chevaux (1)	{ 14,2	Cobayes (1) { 12,1
	{ 12,8	
	{ 12,2	
	{ 11,9	
Bœufs (1)	{ 13,1	Souris (1) { 14,0
	{ 12,5	
	{ 12,2	
	{ 11,9	
	{ 11,8	
	{ 11,0	
Moutons (2)	{ 47	Oies (1) { 8,7
	{ 45	
	{ 44	Canards (2) { 46
	{ 43	
	{ 41,5	
Porcs (1)	{ 14,3	Coqs (1) { 10,1
	{ 14,0	
	{ 13,5	
	{ 13,3	
	{ 12,3	
Chiens (1)	{ 15,2	Pigeons (2) { 38
	{ 14,3	
	{ 14,0	
	{ 13,5	
	{ 12,9	
Lapins (2)	{ 44	
	{ 42	
	{ 41	
	{ 39,5	
	{ 38	

(1) Résultats exprimés en taux $X_{L.b}$ (g d'hémoglobine pour 100 cm³ de sang).

(2) Résultats exprimés en taux X_{Fe} (mg. de fer pour 100 cm³ de sang).

Ces résultats montrent que si la plupart de nos déterminations concordent assez étroitement avec les diverses hémoglobinémies normales publiées (71), il n'en est pas de même lorsqu'il s'agit du coq et surtout de la souris. Ainsi, la souris ne nous a jamais donné de chiffre supérieur à 14,0 alors que la seule hémoglobinémie normale proposée pour cet animal que nous ayons pu relever dans les publications est 19-20 (de KOCH [65]); le résultat moyen de nos dosages chez la souris situerait plutôt cette hémoglobinémie vers 13,7, mais nos dosages sont trop peu nombreux pour que nous puissions faire état de cette moyenne.

§ 2. — L'HEMOGLOBINE CHEZ L'HOMME DANS QUELQUES CAS PATHOLOGIQUES

Nous allons rapporter, pour finir, dans ce paragraphe les hémoglobinémies trouvées pour un certain nombre de malades à l'aide de notre mode opératoire (à partir, ici encore, de sangs prélevés par ponction veineuse et recueillis sur oxalate de potassium).

Nous avons divisé ces résultats en deux groupes:

a) Ceux obtenus dans les néphrites, affections s'accompagnant souvent d'une anémie qui nous avait particulièrement intéressé;

b) Ceux obtenus dans d'autres affections.

a) *Résultats obtenus dans les néphrites:*

Ces résultats ont trait:

- d'une part, aux néphrites aiguës;
- d'autre part, aux néphrites chroniques.

Nous avons rassemblé ces deux sortes de résultats dans le tableau XI en les classant séparément et dans l'ordre des

(71) Ou tout au moins, avec les plus dignes de foi,

hémoglobinémiés décroissantes; nous avons en même temps noté dans ce tableau l'azotémie relative à chaque hémoglobinémie. On peut ainsi constater que dans les néphrites

TABLEAU XI

Malade	X _{Hb} (g. d'hémoglob. pour 100 cm ³ de sang)	Azotémie (exprimée en g. d'urée p. l.)
--------	--	---

I. — Néphrites aiguës

Marcel N.	14,2	1,80
Pierre V.	12,0	2,05
X	9,9	1,20
Laurence A.	9,8	2,30
Léon R.	9,2	1,40

II. — Néphrites chroniques

Jules A.	13,2	0,60
Jean G.	13,0	0,52
L. S.	11,9	0,72
Suzanne L.	10,1	0,65
X	9,8	0,95
Jean G.	9,7	0,88
Fernandez M.	9,1	1,30
X	8,4	2,10
P. O.	6,1	6,50
S. U.	5,1	4,80

chroniques un parallélisme assez net existe entre l'accroissement de l'anémie et celui de l'azotémie (72), et qu'il n'en est rien dans les néphrites aiguës.

b) *Résultats obtenus en dehors des néphrites:*

Ces résultats concernent des malades dont nous avons eu l'occasion de voir évaluer l'hémoglobinémie par la méthode de TALLQVIST [126, 127] comme on le fait trop souvent en clinique. Connaissant l'imprécision de cette méthode (73), nous eûmes la curiosité de reprendre ces déterminations en dosant comparativement leur hémoglobine selon cette même méthode et selon notre mode opératoire.

Nous avons réuni les résultats de ces deux séries de dosages dans le tableau XII (en exprimant, pour permettre les

(72) Parallélisme déjà vu par AUBERTIN, TARÉGEN [128], et d'autres.

(73) Imprécision que nous avons mis en évidence, page 19.

comparaisons, les hémoglobinémies déterminées par la méthode de TALLQVIST non par les pourcentages donnés par l'application normale de cette méthode (74), mais par les taux d'hémoglobine X_{Hb} correspondants).

TABLEAU XII

Malade	X_{Fe} (g d'hémoglobine pour 100 cm ³ de sang) obtenus avec	
	notre mode opérat. la mét. de Tallqvist	
I. — Hémorragies traumatiques		
M. J.	12,3	11,2
Ben A.	11,8	10,3
X.	11,7	13,3
Joseph H.	9,5	9,8
W. K.	8,1	7,0
II. — Paludisme en période de crise		
Amar M.	10,3	9,1
X.	7,8	9,8
L. I.	7,5	7,7
X.	7,3	9,1
Paul N.	6,8	7,7
III. — Paludisme chronique		
X.	14,1	13,3
P. E.	13,6	14,0
Claude S.	13,2	14,0
T. D.	13,1	11,2
X.	12,5	13,3
H. G.	11,1	11,2
X.	10,4	12,6
S. L.	10,3	9,1
Juan F.	9,9	9,8
IV. — Parasitoses intestinales		
O. K.	14,6	14,0
X.	14,0	14,0
Galangou R.	13,8	11,2
J. T.	12,2	14,0
X.	9,9	8,4
Ben M.	9,5	11,2
V. Y.	8,6	8,4
X.	8,2	9,8
V. — Anémie pernicieuse		
Jeanne L.	9,6	9,1
G. U.	7,2	8,4
Noémie D.	5,9	6,3
X.	5,7	7,0
VI. — Ictères hémolytiques		
X.	11,5	12,6
Mohammed A.	11,3	11,9
X.	10,8	13,3
L. R.	10,5	11,2
H. U.	10,2	10,5

(74) Voir page 20,

Comme on le voit, les valeurs données par la méthode de TALLQVIST s'écartent souvent, et sans aucune régularité (75), de celles obtenues pour les mêmes sangs selon notre mode opératoire, ce qui confirme bien l'imprécision de cette méthode.

(75) Excepté toutefois dans les ictères hémolytiques où ces valeurs se montrent constamment trop élevées. Ceci paraît en rapport avec la part anormalement importante que prennent alors les pigments biliaires et les hématies granuleuses dans la réalisation de la teinte du sang.

RESUME

I. — Dans ce travail, nous avons d'abord fait une revue critique des principales méthodes de dosage de l'hémoglobine.

Cette revue comporte les conclusions suivantes:

1° Parmi les méthodes physiques, seules les méthodes spectrophotométriques sont précises; elles sont aussi, une fois montées, très rapides. Ces méthodes ont malheureusement le double inconvénient de nécessiter une série de manipulations préliminaires longues et ingrates et la possession d'un spectrophotomètre.

2° Les méthodes gazométriques sont à délaissier lorsqu'on veut déterminer les hémoglobinémies proprement dites, surtout dans les recherches cliniques.

3° Les méthodes chimiques précises sont:

— d'une part, certaines méthodes volumétriques telles que celle de FONTÈS et THIVOLLE et — moyennant toutefois la modification de sa technique de destruction — celle de MOUSSERON et Mlle CROS.

— d'autre part, certaines méthodes colorimétriques telles que celle de FOWWEATHER et surtout la deuxième méthode de WONG, méthodes qui ont de plus l'avantage d'être particulièrement pratiques.

II. — Nous avons ensuite envisagé la deuxième méthode

de WONG, montré les points faibles de son mode opératoire, et apporté à celui-ci les modifications propres à y remédier.

Nous avons ainsi réalisé une méthode de dosage de l'hémoglobine d'une précision effective de 2 % et présentant la rapidité et la simplicité de moyens de la méthode de WONG.

III. — Enfin, nous nous sommes servi de notre mode opératoire pour doser l'hémoglobine de nombreux sangs normaux humains et animaux, et celle de divers sangs humains pathologiques.

Cela nous a permis de constater, entr'autres faits:

1° Que chez l'Homme l'hémoglobinémie normale ne dépend pas de la race;

2° Que dans les néphrites chroniques l'accroissement de l'anémie suit assez nettement celui de l'azotémie, mais qu'il n'en est pas de même dans les néphrites aiguës.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ABDERHALDEN (E.). — *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, Urban et Schwargenberg, édit., Berlin, 1923.
- [2] ABERHALDEN (E.) et MEDIGRECEANU (F.). — *Zeitsch. f. physiol. Chemie*, 1909, LIX, 165.
- [3] ABDERHALDEN (E.) et MÖLLER. — Recherches sur la teneur du sérum en fer, cuivre et magnésium. *Zt. f. physiol. Chem.*, 1928, CLXXVI, 95-100.
- [4] ADAIR (G. S.). — A critical study of the direct method of measuring the osmotic pressure of hemoglobin. *Proc. Roy. Soc.* 1925, CVIII, A, 627-637.
- [5] ARON. — Aschenanalyse. *Abderhalden, Handb. d. Bioch. Arbeitsmethoden*, I.
- [6] BAUDOIN (A.) et BENARD (H.). — Considérations sur l'application des méthodes optiques à la biologie. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1922, IV, 454.
- [7] BECQUEREL et RODIER. — *Recherches sur la composition du sang dans l'état de santé et dans l'état de maladie*, Paris, 1844.
- [8] BERMAN. — *Journ. biolog. Chemie*, 1918, XXXV, 231.
- [9] BESANÇON (F.) et LABBÉ (M.). — *Traité d'hématologie*. Steinheil, édit., Paris 1904.
- [10] BICART (P.). — Contribution à l'étude de l'hémoglobine au cours des anémies pathologiques ou expérimentales. *Thèse Médecine, Strasbourg*, 1929.
- [11] BIZZOZERO. — Il chromo-citometro. Nuovo strumento per dosare l'emoglobina del sangue. *Atti d. R. Acad. d. Scienze di Torino*, 1879.
- [12] BRANLY (E. E. D.). — *Ann. chim. phys. (S.)* 1882, XXVII, 5^e série, 239.
- [13] BRANLY (E. E. D.) — Dosage de l'hémoglobine dans le sang par les procédés optiques. *Thèse Médecine, Paris*, 1882.
- [14] BROUCKÈRE (DE) (L.) et GILLET (A. E.). — *Bull. Soc. Ch. de Belgique*, 1933, XLII, 281.

- [15] BUNSEN et ROSCOË. — *Poggendorff's Annalen*, C., CVIII et CXVII.
- [16] BÜRKER. — Gewinnung, qualitative und quantitative Bestimmung des Hämoglobins. *Handbuch der phys. methodik v. Tigerstedt*.
- [17] BUTTERFIELD. — *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, LXII, 173.
- [18] CABANES (E.). — Sur les méthodes de dosage optique des solutions colorées. *Thèse pharm., Montpellier*, 1931.
- [19] CANALS (E.) et CABANES (E.). — A propos des essais colorimétriques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1922, XIV, 238-262.
- [20] COHEN (B.) et SMITH (A. H.) — The colorimetric... etc... A practical procedure. *J. Biol. Chem.*, 1919, XII, 489.
- [21] CRISTOL (P.). — *Etude sur la désalbumination du sang et des humeurs en vue du dosage de l'azote total non protéique et de son exploration en physiopathologie*. N. Maloine, édit., Paris, 1926.
- [22] CROVA. — *Ann. Chim. et Phys.*, XXIX, 5^e série, 556.
- [23] DENES (A.). — Sur le spectre d'absorption du globine-hémochromogène et son application au dosage de l'hémoglobine du sang. *Bioch. Z.*, CCLV, 378-387.
- [24] DENIGÈS. — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1929, 81.
- [25] DOMINICI (G.). — Sul dosaggio del ferro. *Folia clinica chimica et microscopica*, 1928, III.
- [26] DOMINICI (G.). — La determinazione quantitativa del ferro nel sangue in condizioni normali e patologiche. *Archivio per le Scienze Mediche*, 1929, LIII.
- [27] DONATH. — *Rif. in Congr. Zentr. f. inn. Medizin.*, XLV, 864.
- [28] DUPRAY-MARTIN. — A colorimetric method of the determination of iron. *Journ. of Laboratory and Clin. med.*, 1927, XII.
- [29] ELVEHJEM et PETERSON. — *J. Biol. Chem.*, 1932, IIIC.
- [30] FLEURY (G.). — Réflexions sur la colorimétrie. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1922, IV, 223.
- [31] FLEURY (P.) et MARQUE (J.) — Dosage du fer sanguin par molybdo-manganimétrie. Nouvelle technique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, XI, 1.123-1.129.
- [32] FISCHER (H.), ZREIBS (A.) et ZEILE (K.). — Ueber den Mechanismus der Eiseneinführung in Porphyrina und Isolierung von kristallisierten Hämen. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1931, C.V.C., 1-27.
- [33] FONTÈS (G.) et THIVOLLE (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1921, III, 23.
- [34] FONTÈS (G.) et THIVOLLE (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1922, IV, 614.

- [35] FONTÈS (G.) et THIVOLLE (L.). — La molybo-manganimétrie et ses applications. 2^e partie: microdosage du fer; application au dosage du fer dans le sang. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, V, 325-340 et 782-793.
- [36] FONTÈS (G.) et THIVOLLE (L.). — Sur la teneur du sérum en fer non hémoglobinique et sur sa diminution au cours de l'anémie expérimentale. *Soc. de Biol.*, 1925, XCIII, 687.
- [37] FONTÈS (G.) et THIVOLLE (L.). — Sur la fixité du rapport entre le fer et la capacité respiratoire maxima (déterminée par CO) dans le sang normal et dans les sangs anémiques. *C.R. Soc. Biol.*, 1931, CVIII, 1.190.
- [38] FONTÈS (G.) et THIVOLLE (L.). — Sur le dosage exact de l'hémoglobine dans le sang normal et le sang anémique. *Comptes rendus de la Société d'hématologie, Sang*, 1932, VI, 207-213.
- [39] GOUY. — *Thèse Sciences, Paris*, 1879.
- [40] GRÉHANT. — Dosage de l'hémoglobine par l'oxygène absorbé. *Comptes Rendus*, 1872, LXXV.
- [41] GREY. — *Journ. Chem. Soc.*, 1929, 35.
- [42] HALDANE (J.) — The ferricyanid method of determining the capacity of blood. *J. of. Physiol.*, 1900, XXV, 295-302, 1 figure.
- [43] HALLION et BORRIEN. — *Comptes rendus de la Société d'hématologie, Sang*, 1934, VIII, 224-227.
- [44] HANSKAR (F. M.). — Méthode de détermination quantitative de la bilirubine du sang. *Sang*, 1930, IV, 458-459.
- [45] HAYEM. — Procédé de dosage de l'hémoglobine par l'oxygène absorbé. *Société de Biologie*, 1877.
- [46] HEDENSTRÖM (Von) et KERNAN. — Etude de la réaction du sulfocyanure ferrique. *Z. anal. Chem.* 1932, XCI, 17-25.
- [47] HÉNOCQUE. — *Arch. d'anat. micr.*, 1900, III.
- [48] HÉNOCQUE. — Spectroscopie biologique. *Aide-mémoire Léauté*.
- [49] HENRIQUEZ (V.) et ROCHE (Mme) (A.). — Sur le fer du sérum de diverses espèces animales. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, IX, 501-527.
- [50] HOPPE-SEYLER (F.) — *Med. chem. Untersuchungen*, 1868, 366.
- [51] HOPPE-SEYLER (F.). — *Traité d'analyse chimique appliquée à la physiologie, etc...* (traduit par Schlagdenhauffen), Paris, 1877.
- [52] HORNEFFER LUTZ. — Le sang humain étudié par de nouvelles méthodes. *Pflüger's Archiv.*, 1928, CCXX, 703-713 et 716-737.
- [53] HOWARD (F. H.). — The determination of the refractivity of hemoglobin in solution. *J. Biol. Chem.*, 1920, XLI, 537.
- [54] HUBER (E.) — *Détermination clinique de l'hémoglobine chez les animaux domestiques avec l'hémoglobininètre de Bürker*. Thèse vétérinaire, Giessen, 1928.

- [55] HÜFNER (G.). — Ueber quantitative Spectralanalyse und ein neues Spectrophotometer. *Journ. f. prakt. Chemie*, 1877, XVI.
- [56] HÜFNER (G.). — *Arch. f. anat. u. Phys.*, 1894, 174.
- [57] ILINSKY et KNORRE. — *D. Ch. G.*, 1885, XVIII, 2.738.
- [58] JACQUET (A.). — *Zeitsch. f. physiol. Chemie*, 1888, XII, 285.
- [59] JOLLY (J.). — *Soc. de Biologie*, 1909.
- [60] JOLLY (J.). — *Traité technique d'hématologie*, A. Maloine et fils, édit., 1923, I, 168-177.
- [61] JOLYET et LAFFONT. — Capacité respiratoire du sang par la méthode colorimétrique. *Société de Biologie*, 1877.
- [62] KAHANE. — *Ann. de Ch. analytique*, 1927, IX, 196.
- [63] KING et HOWARD. — *Journ. Biol. Chem.*, 1927, LXXV, 27.
- [64] KNECHT et HIBBERT. — New reduction methods in volumetric analysis. *Longmans Green and Co*, 1910.
- [65] KOCK (DE) (G.). — Studies on the blood of mice. 17 *th Report of the Director of veterinary services and animal industry*, Union of South Africa, 1931, 573-616.
- [66] KÖNIG (J.). — *Chem. Ztg.*, 1897, XXI, 599.
- [67] KUGELMASS. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1922, IV, 577.
- [68] LABBÉ (M.). — *Revue de Médecine*, 1.900, XX.
- [69] LACHS et FRIEDENTHAL. — Die Bestimmung des Eisens auf colorimetrischen Wege. *Bioch. Zeitschr*, XXXII, 130.
- [70] LAMBLING (F.). — Des procédés de dosage de l'hémoglobine. *Thèse Médecine*, Nancy, 1882.
- [71] LAMBLING (F.). — Chimie des liquides et tissus de l'organisme, troisième partie, I. *Encyclopédie chimique de Frémy*, 1895, IX.
- [72] LAPICQUE (L.). — Sur le dosage du fer dans les recherches physiologiques. *Thèse Médecine*, Paris, 1895.
- [73] LAPICQUE (L.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1897, VII, 3^e série, 81-113.
- [74] LEROY, CAY et ANDERSON. — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1921, XLIII.
- [75] LESSER. — Ueber die Vertheilung der rothen Blutscheiben im Blutstrom. *Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt.*, 1878.
- [76] LETSCHE. — *Z. physiol. Chem.*, LXXVI, 256.
- [77] LINTZEL. — *Zeitschr. für Biol.*, 1928, LXXXVII, 157.
- [78] LUNDGAARD (C.) et MÖLLER (E.) — On the determination of the total oxygen combining power of blood in the Van Slyke apparatus. *J. Biol. Chem.*, 1922, LII, 377.
- [79] LUNGE (G.). — *In. Chemisch. technisch. Untersuchungsmethoden*, Berlin.
- [80] MAC FARLANE. — Détermination du fer dans les substances organiques, etc... *Bioch. J.*, 1932, XXVI, 1034-1049,

- [81] MALASSEZ. — Sur les procédés de dosage de l'hémoglobine et un nouvel hémochromomètre. *Arch. de physiologie*, 1877.
- [82] MALASSEZ. — *Arch. de physiologie*, 1882.
- [83] MARGUERITTE. — *Ann. de chim. et de phys.*, 1846, XVIII, 3^e série, 224.
- [84] MOREAU (B.). — Recherches sur le dosage du fer dans le sang... etc... *Thèse Médecine, Lyon*, 1901.
- [85] MOREL (A.). — *Précis de technique chimique à l'usage des laboratoires médicaux*, O. Doin et fils, édit., Paris, 1909.
- [86] MOUSSERON (M.) et CROS (Mlle). — Sur un microdosage du fer. *Bull. Soc. Chim.*, 1930, XLVII, 4^e série, 783-785.
- [87] MOUSSERON (Mme) (M.). — La microanalyse du fer et du zinc. *Thèse Pharmacie, Montpellier*, 1932.
- [88] MURMERY. — *Analyst.*, 1926, LI, 511.
- [89] NEUMANN (A.). — Ueber eine einfache Methode der Eisenbestimmung u. s. w. *Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abteil.*, 1902.
- [90] NEUMANN (A.). — Einfache Veraschungsmethoden des Eisen u. s. w. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1902, XXXVII, 120.
- [91] NEWCOMER (H. S.). — Absorption spectra of acid hematin, oxyhemoglobin and carbonmonoxide hemoglobin. A new hemoglobinometer. *J. Biol. Chem.*, 1919, XXXVII, 465.
- [92] NICLOUX (M.). — Appareil pour l'extraction de l'oxyde de carbone du sang. *Soc. de Biologie*, 1914, LXXV, 57.
- [93] NICLOUX (M.) et WELTER. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1921, III, 170.
- [94] NOLF. — Hémoglobine. *Dictionnaire de physiologie de Charles Richet*.
- [95] OSTWALD. — *Grundlinien der anorganischen Chemie*; III. Aufl. Engelmann, édit., Leipzig, 1912.
- [96] OTTO (J. C.). — *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 1882, VII, 57.
- [97] OTTO (J. C.). — *Maly's Jahresh.*, 1885, XV, 144.
- [98] PALMER (W. W.). — The colorimetric determination of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 1918, XXXIII, 119.
- [99] PETERS (J. P.) et VAN SLYKE (D. D.). — *Quantitative clinical chemistry*, Baillière, Tindal et Cox, édit., Londres, 1932, II.
- [100] PETERS (R. A.). — Clinical nature of specific oxygen capacity in hemoglobin. *J. of physiol.*, 1912, XLIV, 131.
- [101] PEYRE (E.). — Hémoglobininmètre de Salhi modifié pour exprimer en poids l'hémoglobine contenue dans le sang. *Bull. et Mémoires de la Société médic. des Hôp. de Paris*, 1927, 920-921.
- [102] POLONOVSKI (M.) et LESPAGNOL (A.). — *Éléments de Chimie Organique Biologique*, Masson et Compagnie, édit., Paris, 1934.

- [103] PONDER (E.). — Emploi du stuphenphotomètre pour mesurer le degré de l'hémolyse. *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, 1930, XXVII, 821.
- [104] PREYER. — De haemoglobino observationes et experimenta. *Diss. Bonn.*, 1866.
- [105] PREYER. — *Die blutkrystalle*, Iéna, 1871.
- [106] PTASZECK (L.). — Owplywie zakazen na zdolnosc chloniénia tlenu pzzek krew; *Polska Gazeta Lekarska*, 1931, XI, 497-502.
- [107] QUECKENSTEDT. — Untersuch. ueber den Eisenstoffw. u. s. w. *Zeitschr. f. Klin. med.*, 1913, LXXIX, 49.
- [108] QUINCKE. — Ein Apparat zur Blutfarbstoffbestimmung. *Berlin Klin. Wochenschr.*, 1878.
- [109] RAJEWSKI. — Ueber die quantitative Bestimmung der Haemoglobulingehalts im Blut. *Arch. der Pflüger*, 1875, XII.
- [110] REGNARD. — Sur les variations des combustions pathologiques des combustions respiratoires. *Thèse Médecine, Paris*, 1878.
- [111] ROCHE (J.). — Sur la biochimie comparée des pigments respiratoires. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, XVI, 793-821.
- [112] RONCATO. — Il dosamento del ferro nel sangue. *Archivio di scienze biologiche*, 1924, VI, 278.
- [113] ROSENHEIM et COHN. — *Zeits. anorg. Chemie*, 1901, XXVII, 280.
- [114] ROSTOSKI et CRECELIOUS. — Un nouvel appareil de détermination de la teneur en hémoglobine du sang. *Münch. Mediz. Woch.*, 1927, LXXIV, 330-331, 1 figure.
- [115] SAINT-MARTIN (DE) (L. G.) — *Dosage de l'hémoglobine au moyen du spectrophotomètre*, O. Doin, édit., Paris, 1898.
- [116] SAINT-MARTIN (DE) (L. G.). — *Quatrième Congrès international de physiologie*, Cambridge, 1900.
- [117] SCHMOLL (G.) — Recherches sur le sang humain au moyen de méthodes modernes. IV: Détermination de la valeur absolue de la quantité d'hémoglobine. *Pfüger's Archiv.*, 1931, CCXXVII, 160-170.
- [118] SCHUTZEMBERGER et RISSLER. — Dosage de l'oxygène par l'hyposulfite de soude. *Bull. Soc. Chim.*, 1873, XX.
- [119] SMITH et COOK. — *Analyst*, 1926, LI, 503.
- [120] SÖRENSEN. — *Zeitschr. f. anal. Chem.*, 1903, 352 et 512.
- [121] STADIE (W. C.) — A method for the determination of the methemoglobin in blood. *J. Biol. Chem.*, 1920, XLI, 237.
- [122] STODDARD (J. L.) et ADAIR (G. S.) — The refractometric determination of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 1923, LVII, 437.
- [123] SVEDBERG (T.). — Les molécules dans un champ centrifuge intense. *Journ. Phys. et Rad.*, 1931, II, 7^e série, 227-236.

- [124] SZEGOE (L.) et CASSONI (B.) — *Giorn. Chim. Ind. Applicata*, 1933, XV, 281-283.
- [125] SZEGOE (L.) et CASSONI (B.) — *Annales de Ch. analytique*, 1934, XVI, 188.
- [126] TALLQVIST. — *Zeitschrift f. klin. Medicin.*, 1900, XL.
- [127] TALLQVIST. — *Archives gén. de médecine*, 1900, III, nouvelle série.
- [128] TARÉGEN (E.). — L'anémie brightique. *Archives des maladies du cœur*, etc..., 1931, XXIV, 627-635.
- [129] TIFFENAU. — Hémoglobine. *Traité du sang de Gilbert et Weinberg*, 1913, I, 102.
- [130] TRAUNIN. — *Thèse Sciences, Lille*, 1877.
- [131] TUKATS. — Dosage du fer dans le matériel biologique. *Proc. Soc. exp. Biol. med.*, 1933-1934, XXX, 846.
- [132] VALDEMAR (H.) et ROCHE (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, IX, 527.
- [133] VAN SLYKE (D. D.) — Study of acidosis. II: A method for the determination of carbon dioxyde and carbonates in solution. *J. Biol. Chem.*, 1917, XXX, 347.
- [134] VAN SLYKE (D. D.) — Note on a portable form of the manometric gas apparatus, and on certain points in the technique of its use. *J. Biol. Chem.*, 1927, LXXIII, 121.
- [135] VAN SLYKE (D.D.) et HILLER (A.) — Gasométric determination of hemoglobin by the carbon monoxyde capacity method. *J. Biol. Chem.*, 1928, LXXVIII, 807.
- [136] VAN SLYKE (D. D.) et NEILL (J. M.) — The détermination of gases in blood and other solutions by vacuum extraction and manometric measurement; I. *J. Biol. Chem.*, 1924, LXI, 523.
- [137] VIERORDT (K.) — Die Anvendung des Spectralapparates zur Photometrie der Absorptionsspectren und zur quantit. chem. Analyse. *Tübingen*, 1873.
- [138] VIERORDT (K.). — Die quantitative Spectralanalyse in ihrer Anwendung auf Physiol..., etc. *Tübingen*, 1876.
- [139] VLÈS (F.). — *Travaux pratiques de physique biologique et de chimie physique*, Vigot, édit., Paris, 1927.
- [140] WELCKER. — Ueber Blutkörperchenzaehlung und farbenprüfende Methode. *Vierteljahrssch. f. d. prakt. Heilkunde*, 1854, XLIV.
- [141] WILLIAMSON (C. S.) — Influence of age and sex on hemoglobin. A spectrophotometric analysis of 990 cases. *Arch. int. Med.*, 1916, XVIII, 505.
- [142] WILLSTATTER. — *Ber. d. Deut. Chemische Gesellschaft*, 1920, LIII, 1.152,

- [143] WONG (S. Y.). — Colorimetric determination of iron and hemoglobin in blood. *Journ. Biol. Chem.*, 1923, LV, 421.
- [144] WONG (S. Y.). — Colorimetric determination of iron and hemoglobin in blood. II. *J. Biol. Chem.*, 1928, LXXVII, 409.
- [145] WU (H.). — Studies on hemoglobin. I: The advantage of alkaline solutions for colorimetric methods for the determination of hemoglobin. *J. Biochem. (Japan)*, 1922, II, 173.

TABLE DES MATIERES

	Pages
AVANT-PROPOS	7
INTRODUCTION	9
CHAPITRE PREMIER. — PRELIMINAIRES	12
CHAPITRE II. — LES PRINCIPALES METHODES DE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE ET LEURS CARACTERISTIQUES	16
§ 1. — <i>Méthodes physiques</i>	17
A. — Méthodes chromoscopiques	17
B. — Méthodes colorimétriques	22
C. — Méthodes spectroscopiques	28
D. — Méthodes spectrophotométriques	30
§ 2. — <i>Méthodes gazométriques</i>	35
§ 3. — <i>Méthodes basées sur le dosage du fer</i>	40
A. — Méthodes gravimétriques	42
B. — Méthodes volumétriques	43
C. — Méthodes colorimétriques	52
D. — Méthodes potentiométriques	58
CHAPITRE III. — LE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE PAR LA METHODE DE WONG. — UN NOUVEAU OPERATOIRE; SA VALEUR ..	59
§ 1. — <i>La méthode de Wong; sa précision réelle</i> ..	59
§ 2. — <i>Nos modifications au mode opératoire de Wong; leurs raisons</i>	64
§ 3. — <i>Ensemble du nouveau mode opératoire; sa valeur</i> ..	76
Note sur le recueil des sangs	81
CHAPITRE IV. — QUELQUES RÉSULTATS DE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE SELON NOTRE MODE OPÉRATOIRE	83
§ 1. — <i>L'hémoglobulinémie chez l'Homme et divers animaux à l'état normal</i>	83
§ 2. — <i>L'hémoglobulinémie chez l'Homme dans quelques cas pathologiques</i>	90
RESUMÉ	94
BIBLIOGRAPHIE	96

En ma qualité de Censeur de
tour, j'ai lu la thèse ayant pour
titre:

« Sur le dosage de l'Hémoglobine »
par M. Jean FOURCADE

Je pense que la Faculté peut
en permettre l'impression.

Montpellier, le 29 juin 1936.

Le Professeur,

E. CANALS.

Vu:

Montpellier, le 30 juin 1936,

Le Doyen,

A. ASTRUC.

Vu et permis d'imprimer :

Montpellier, le 30 juin 1936,

Le Recteur,

TAILLIART.

